Aus dem Institut für Physiologische Chemie
der Philipps-Universität in Marburg

Direktor: Prof. Dr. Dr. P. Karlson

Entwicklungsspezifische und hormonabhängige Veränderungen bei den Ribonukleinsäuren von Calliphora erythrocephala

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
(Dr. rer. physiol.)

eingereicht dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

Von
PETER MASCHECK
aus Dortmund

Marburg/Lahn 1978

Aus dem Institut für Physiologische Chemie
der Philipps-Universität in Marburg

Direktor: Prof. Dr. Dr. P. Karlson

Entwicklungsspezifische und hormonabhängige Veränderungen bei den Ribonukleinsäuren von Calliphora erythrocephala

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
(Dr. rer. physiol.)

eingereicht dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

Von
PETER MASCHECK
aus Dortmund

Marburg/Lahn 1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der
Universität Marburg am 29.6.1978
gedruckt mit Genehmigung der Fakultät
Dekan: Prof. Dr. med. Neurath
Referent: Prof. Dr. rer. nat. Karlson
Korreferent: Dr. K. Scheller

Die vorliegende Arbeit wurde am
Institut für Physiologische Chemie
der Philipps-Universität Marburg
unter der Leitung von
Herrn Prof. Dr. Dr. P. Karlson
angefertigt.
Herrn Prof. Dr. Dr. P. Karlson
und Herrn Dr. K. Scheller danke
ich für die Unterstützung bei
der Durchführung der Arbeit.
Ebenso gilt mein Dank
Herrn Prof. Dr. M. Beato,
Herrn Dr. J. Koolman und
Herrn Dr. A. Alonso.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546009_0059

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einführung	1
2. Material und Methoden	9
2.1 Material	9
2.2 Methoden	10
2.2.1 Calliphora-Zucht	10
2.2.2 Isolierung von DNA	10
2.2.3 T_m-Wertbestimmung	11
2.2.4 Analytische CsCl Zentrifugation	11
2.2.5 Denaturierung und Renaturierung	12
2.2.6 Korrektur der Komplexität der intermediären Sequenzen	13
2.2.7 Isolierung von unique DNA	14
2.2.8 DNA-Jodierung	14
2.2.9 Isolierung von RNA	15
2.2.10 Isolierung von Poly(A) RNA	16
2.2.11 DNA-RNA Hybridisierung	16
2.2.12 Synthese von cDNA	18
2.2.13 Poly(A) RNA-cDNA Hybridisierung	19
3. Ergebnisse	21
3.1 Untersuchung der DNA	21
3.1.1 Schmelzpunktbestimmung	21
3.1.2 CsCl-Gradientenzentrifugation	24
3.1.3 Renaturierungsexperimente	25
3.2 Hybridisierungen	34
3.2.1 Jodierung der DNA	36
3.2.2 Hybridisierung von Gesamt-Nukleinsäuren	36
3.2.3 Hybridisierung von unique DNA mit poly(A) RNA	40
3.2.4 Hybridisierung von poly(A) RNA gegen die eigene cDNA	42
4. Diskussion	48

	Seite
5. Zusammenfassung	60
6. Verzeichnis der Abkürzungen	62
7. Literaturverzeichnis	63

1. Einführung

Hormone sind Substanzen, die in Drüsen oder Geweben gebildet werden, über das Blut bzw. die Hämolymphe ihr Zielgewebe erreichen und dort ihre Wirkung ausüben, manchmal erst nach einer Umwandlung. Aufgrund ihrer chemischen Struktur lassen sich die Hormone in mehrere Klassen einteilen, die sich z.T. in ihren Wirkungsmechanismen unterscheiden. Die aus Aminosäuren zusammengesetzten Peptidhormone reagieren mit membranständigen Rezeptoren und beeinflussen eine Vielzahl intrazellulärer Prozesse mit Hilfe von Mediatoren (auch second messenger genannt).

Die Steroidhormone, zu denen die männlichen und weiblichen Sexualhormone wie Androgene, Östrogene und Gestagene, die Nebennierenrinden-Hormone und ebenso die Ecdysteroide als Vertreter der Insektenhormone gehören, haben ein Molekulargewicht von ungefähr 300-450 D und können leicht in verschiedene Zellen diffundieren, aber auch wieder zurück ins Blut gelangen. Der Grundkörper der Steroide ist das aus vier Ringen bestehende Steran. Die Konzentration der Steroide im Blut ist mit ungefähr 10^{-9} Mol/l für derartig wirksame Stoffe sehr niedrig. Hormone haben eine hohe Spezifität: obwohl eine große Anzahl verschiedener Zellen mit den Hormonen in Berührung kommt, reagieren nur wenige, bestimmte Zellen. Hierfür ist die Anwesenheit bestimmter Proteine, Rezeptoren genannt, verantwortlich, die das Hormon binden können und möglicherweise auch Transportfunktionen für das Hormon besitzen.

Bei der intrazellulären Wirkung von Steroidhormonen hat man u.a. folgende Effekte beobachtet:

1. Reaktion der Steroidhormone mit den Steroidrezeptoren im Cytoplasma der Zelle,
2. Anreicherung eines Hormon-Rezeptor-Komplexes im Kern,
3. Anlagerung an bestimmte Bereiche des Chromatins,
4. Anregung der Transkription (O'Malley und Mc Guire, 1969; Couch und Anderson, 1973; Breuer und Florini, 1966; Davies und Griffiths, 1973; Beato et al., 1968; Dahmas und Bonner, 1965; Liew et al., 1972; Lang et al., 1968),
5. Auftreten von heterogener RNA im Kern als primäres Transkriptionsprodukt (Forte und Landon, 1968; Congote und Trachewski, 1972),
6. Auftreten von qualitativ neuer mRNA (O'Malley, 1969; Church und Mc Carthy, 1970; O'Malley und Mc Guire, 1969; Drews und Brawerman, 1967; Doenecke und Sekeris, 1970),
7. Anregung der Proteinsynthese.

Die Frage, wie diese Wirkungen zustandekommen und durch welche Strukturen und Mechanismen sie reguliert werden können, ist ein Hauptanliegen der molekularen Biologie.

Die Molekularbiologie ist hierbei durch die Beobachtung analoger Regulationsmechanismen bei Mikroorganismen einen großen Schritt weitergekommen. Der von Jacob und Monod 1961 nach Studien am Lac-Operon von E. coli formulierten Hypothese zufolge ist einer Kette von Strukturgenen ein Operatorgen vorgeschaltet. Dies kann durch einen von einem Regulatorgen codierten Repressor blockiert werden. Durch einen Induktor wird das Repressorprotein gebunden und das Operatorgen dadurch frei. Die RNA-Polymerase kann nun von ihrer Initiationsstelle aus, dem Promotor, die nachfolgenden Gene

zu einer polycistronischen mRNA transkribieren, die dann an den Polysomen zu Proteinen translatiert wird.

Daß eine Regulation der Proteinbiosynthese bei Prokaryonten primär auf dem Niveau der Transkription stattfindet, drückt sich bei erhöhter Proteinsynthese durch erhöhte mRNA-Synthese aus und ließ sich u.a. für das Histidin-, Tryptophan-, Lactose- und Galaktosesystem zeigen.

Daneben gibt es bei den Prokaryonten wahrscheinlich noch andere Regulationsmechanismen der Proteinbiosynthese, auch auf der Translationsebene.

Bei Eukaryonten ist die Situation auf Grund ihrer andersartigen Strukturierung, mit dem Auftreten eines Kerns, heterogener DNA, von Kernproteinen, heterogener RNA, poly(A) RNA u.a., wesentlich komplexer.

Die DNA ist aus Sequenzen verschiedenen Wiederholungsgrades zusammengesetzt. Man unterscheidet hoch repetitive Sequenzen, die sich hauptsächlich am Zentromer der Chromosomen befinden und mittel- und nicht repetitive Sequenzen, die mehreren Untersuchungen zufolge in einem bestimmten Muster angeordnet sind (Davidson et al., 1973; Graham et al., 1973; Angerer et al., 1975; Laird und Mc Carthy, 1969).

Im Unterschied zu den Prokaryonten ist bei den Eukaryonten die DNA von Histonen und Nichthistonproteinen umgeben, wobei die Nukleosomen, die aus 2 Histonmolekülen und 140 Nukleotidpaaren DNA bestehen, regelmäßige Struktureinheiten des Chromatins darstellen und über das ganze Genom verteilt sind (Reeves, R., 1976; Tienkuo et al., 1976).

Vom primären Transkriptionsprodukt, der heterogenen RNA, werden 90 % noch im Kern schnell wieder abgebaut (Britten und Davidson, 1971) und nur etwa 10 % gelangt meist nach Anhängen eines poly(A) Abschnittes an das 3'Ende und weiterer posttranskriptionaler Veränderung (Molloy et al., 1974) in das Cytoplasma.

Auch bei Eukaryonten tritt das Phänomen der Enzyminduktion auf, oft nicht durch Substrate, sondern durch die für Eukaryonten spezifischen Effektoren, die Hormone, ausgelöst.

Es gibt mehrere Möglichkeiten, wie Hormone in der eukaryotischen Zelle regulierend auf die Proteinsynthese einwirken könnten. Ein Angriff an der DNA oder an der RNA-Polymerase könnte die Transkription beeinflussen. Hormone könnten auch in dem Prozeß der Polyadenylierung eine Rolle spielen und damit über eine Stabilisierung oder Degradation der mRNA wirken.

Außer Frage kann nach den auf S. 2 der Einleitung geschilderten intrazellulären Wirkungen angenommen werden, daß Steroidhormone die Transkription in Zielgeweben beeinflussen (O'Malley und Mc Guire, 1969; Couch und Anderson, 1973; Breuer und Florini, 1966; Davies und Griffiths, 1973; Beato et al., 1968; Dahmas und Bonner, 1965; Liew et al., 1972; Lang et al., 1968).

Es gibt Hypothesen, die die bei den Eukaryonten beobachteten komplexen Strukturen zu erklären versuchen. O'Malley und Schröder (1976) haben z.B. eine Hypothese über die Bindung eines Hormon-Rezeptor-Komplexes am Chromatin einer Zielstelle aufgestellt.

Die Folgen einer Genaktivierung werden durch die Genaktivierungsmodelle zu erklären versucht. Georgiev (1969) postulierte ein aus Transkriptionseinheiten bestehendes Chromosomenmodell, in dem auf eine Promotorzone eine Acceptorzone mit Bindungsstellen für Regulatorproteine und dann eine Strukturzone folgt. Dieses Modell gibt keine Erklärung für die hoch repetitiven Sequenzen am 5'Ende der hnRNA, die von Paul (1972) als Nonsense Mutation bezeichnet wurden.

Den Modellen von Georgiev, Paul und Crick, die einen einstufigen Kontrollmechanismus postulieren, steht ein Modell von Britten und Davidson gegenüber, das repetitive Sequenzen als funktionell für die Regulation und die Aktivierung verschiedener Gene als Stimulationsfolge eines Hormons erklärt.

Voraussetzung um Einblick in die Regulation zellulärer Ereignisse durch Hormone zu gewinnen, ist die Kenntnis der Hormonverteilung und des eventuell entwicklungsabhängigen Hormontiters im entsprechenden Organismus.

Die bei unseren Untersuchungen verwendete Schmeißfliege Calliphora erythrocephala gehört wie Drosophila, Musca oder Sarcophaga zu den Dipteren. Die Entwicklung von Calliphora verläuft vom Ei über drei Larvenstadien und das Puppenstadium zur Imago. Die Häutung zwischen Ei und Larve wird als embryonale Häutung bezeichnet und wie die larvale Häutung durch Ecdyson in Gegenwart von Juvenilhormon ausgelöst. Sinkt der Juvenilhormontiter, so kommt es durch Ecdyson zur Puparienbildung und schließlich, wenn kein Juvenilhormon mehr vorhanden ist, zur Imaginalhäutung.

Über die Wirkform des Insektenhormons Ecdyson ist man sich noch nicht im klaren. Es wird in der Prothoraxdrüse gebildet, daneben liegt aber in Zielgeweben wie der Epidermis, wie aber auch im Fettkörper, das in den meisten biologischen Systemen aktivere Ecdysteron vor. Beide scheinen eigene Hormonwirkungen zu haben.

Mit einem standardisierten Calliphora-Test konnte der Ecdysontiter von Calliphora erythrocephala bestimmt werden und es zeigte sich kurz vor der Puppariumbildung ein Anstieg des Ecdysonspiegels mit einem Maximum 5-6 Stunden nach der Puppariumbildung. Ein zweites Maximum zeigt sich während der Imaginalentwicklung.

Bei dem Versuch einen Ecdysonrezeptor zu isolieren, konnten Thamer und Karlson in der Hämolymphe ein ecdysonbindendes Protein nachweisen und ebenso im Fettkörper ohne allerdings zu genaueren Charakterisierungen zu kommen.

Einblicke in den intrazellulären Weg des Ecdysons gaben folgende Experimente:

Clever und Karlson stellten 1960 die Induktion von Puffveränderungen in den Speicheldrüsenchromosomen von Chironomus tentans durch Ecdyson fest und schlossen daraus auf eine mögliche Genaktivierung.

Eine Stunde nach Ecdysonbehandlung wird in der Epidermis von Calliphoralarven die Kern-RNA stark erhöht (Karlson und Peters, 1965; Sekeris und Lang, 1965). Einige Stunden später hat sich mRNA im Cytoplasma angesammelt und es kommt zur Ausbildung polysomaler Strukturen (Marmaras und Sekeris, 1972).

Mit dem Nachweis der Induktion von Dopa Decarboxylase konnte in der Epidermis die Stimulation der Synthese eines spezifischen Proteins durch eine Ecdysoninduzierbare mRNA-Fraktion nachgewiesen werden (Sekeris und Lang, 1964; Fragoulis und Sekeris, 1975). Congote zeigte 1970, daß in Fettkörperzellkernen unter Ecdysoneinfluß synthetisierte RNA qualitative Unterschiede zu Kontroll-RNA aufweist. Nachdem Scheller und Karlson festgestellt hatten, daß Ecdysteron die RNA-Synthese im Fettkörper stimuliert und daß die ecdysteroninduzierte RNA neben ribosomaler RNA auch poly(A) RNA enthält, tauchte die Frage auf, inwieweit die ecdysteroninduzierte poly(A) RNA neu transkribierte DNA-Abschnitte repräsentiert. Obwohl poly(A) RNA nicht mit mRNA gleichzusetzen ist, stellt sie doch zumindest einen Teil der mRNA dar. Die Frage, die mit dieser Arbeit beantwortet werden soll ist, ob die durch Ecdysteron stimulierte poly(A) RNA-Synthese auf der Transkription bisher nicht transkribierter DNA-Abschnitte beruht, d.h. ob eine qualitativ unterschiedliche poly(A) RNA gebildet wird. Dies kann durch Hybridisierung der poly(A) RNAs verschiedener Entwicklungsstufen mit DNA untersucht werden. Da alle bisher untersuchten isolierten mRNAs Transkripte der "unique DNA-Fraktion" sind, wurde die Hybridisierung mit unique DNA durchgeführt, was neben einer Erhöhung des Hybridisierungsprozentsatzes methodische Vorteile hat.

Das Ergebnis ist der Hybridisierungsprozentsatz zwischen poly(A) RNA und unique DNA. Er gibt an, wieviel Prozent der eingesetzten DNA jeweils hybridisiert worden sind und damit den Anteil der unique DNA, der im jeweiligen Entwicklungsstadium als poly(A) RNA Kopie vorliegt.

1. Wie ist die poly(A) RNA zusammengesetzt?

2. Ändert sich dies unter Ecdysteroneinfluß? Um diese Komplexitätsbestimmung der poly(A) haltigen RNA durchführen zu können, wurden mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase komplementäre DNAs zu den poly(A) RNAs zweier Entwicklungsstufen hergestellt und durch Hybridisierung mit den Template RNAs deren Komplexität bestimmt.

2. Material und Methoden

2.1. Material

Ecdysteron stammte von Rohto (Osaka), ^{3}H dCTP wurde von The Radiochemical Center (Amersham) bezogen, die Nukleosidtriphosphate von Boehringer (Mannheim), Sephadex G25 und G 50 von Pharmacia (Uppsala), Oligo $(dT)_{12}$ von Collaborative Research (Waltham, Mass.), Chelex 100 von Biorad (München), Dithiothreitol, Escherischia coli DNA und Coliphagen T4 DNA von Serva (Heidelberg), Kalbsthymus DNA und Micrococcus lysodeikticus DNA von Sigma (München), ribonukleasefreie Sucrose von Serva (Heidelberg). Die Reverse Transkriptase, hergestellt nach Kacian und Spiegelman, 1973, war ein Geschenk von D.J. Beard (St. Petersburg, Florida). Ribonukleasefreie DNase wurde von Boehringer (Mannheim) bezogen, Pronase, Laurylsarcosinat und SDS von Serva (Heidelberg). Laurylsarcosinat und SDS wurden aus destilliertem Äthanol umkristallisiert. Von Pharmacia (Uppsala) stammte die Poly(U) Sepharose 4B, von NEN (Dreireich) Na ^{125}J in 0,1 M NaOH, $TlCl_3$ von ICN (Plainview), Glasfiberfilter GF/C von Whatman (London) und Kälberserumalbumin von Serva (Heidelberg). S1 Nuklease von Aspergillus oryzae, hergestellt nach der Vorschrift von Vogt (1973), war ein Geschenk von Prof. J. Niessing (Marburg). CsCl Suprapur stammte von der Firma Merck (Darmstadt). Alle anderen Chemikalien waren p.a. Reagenzien.

Puffer:

Puffer A: 0,15 M NaCl; 0,015 M Natriumcitrat, pH 7,0

2.2. Methoden

2.2.1 Calliphora-Zucht

Calliphora vicina R.-D. (Calliphora erythrocephala Meigen) Larven wurden auf Rindfleisch bei 25° C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 65 % gezogen. Um die Entwicklung der Larven zu synchronisieren, ließen wir die Fliegen nur 45 Minuten pro Tag Eier ablegen. Unter diesen Bedingungen verließen die Larven 6 Tage nach der Eiablage das Fleisch und verpuppten sich nach 7 Tagen.

2.2.2 Isolierung von DNA

DNA wurde aus gesamten Tieren von Calliphora verschiedener Altersstufen isoliert. Dazu wurden 200 g der Tiere in einem Puffer aus 50 mM Tris (pH 7,6), 25 mM KCl, 5 mM MgAc, 5 mM Natriumcitrat, 0,35 M Saccharose gewaschen und in 400 ml desselben Puffers eiskalt homogenisiert. Das Homogenat wurde durch mehrere Lagen Gaze filtriert und zehn Minuten lang bei 550 g zentrifugiert. Das rohe Kernpellet wurde 15 Minuten lang mit 100 ml eines eiskalten Puffers aus 50 mM Tris (pH 7,2), 50 mM NaCl, 6% 4-Aminosalicylat, 1 % SDS, 1 % Laurylsarcosinat, 1 % TNS geschüttelt. Nach Zusatz von 100 ml PCJ (49 Teile Phenol, 49 Teile Chloroform, 2 Teile Isoamylalkohol) wurde weitere 15 Minuten lang geschüttelt. Nach einer 20 minütigen Zentrifugation bei 5000 g wurde der Überstand erneut mit 1 Volumen PCl extrahiert, worauf eine zweite 20 Minuten lang dauernde Zentrifugation bei 5000 g erfolgte. Der Überstand wurde auf einen NaCl-Gehalt von 12 % gebracht, mit 1 Volumen Äthanol versetzt und über Nacht stehengelassen.

Die mit Äthanol gefällte DNA wurde in 0,18 M äquimolarem Phosphatpuffer (Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4, pH 6,8) gelöst und weiter mittels Hydroxylapatitchromatographie gereinigt (Markov und Ivanov, 1974).

2.2.3 Tm-Wertbestimmung

Die Tm-Wertbestimmung wurde mit dem Ultraviolett-Absorptionstemperaturprofil im Tm-Zusatz des Spektrophotometers Beckman Acta CII durchgeführt.

Die DNA-Proben waren zu 20 µg/ml in Puffer A gelöst. Nach dem Entgasen der sich in den Küvetten befindenden Lösungen wurde die Absorption zunächst bei 25° C gemessen, dann schnell auf 60° C aufgeheizt und zum Druckausgleich noch einmal belüftet. Die fest verschlossenen Küvetten wurden dann mit einer Temperatursteigerung von 0,2° C/Minute bis 98° C erhitzt. Die gemessenen Absorptionswerte wurden wegen der Temperaturausdehnung der wässrigen Lösungen mit den bei Mandel und Marmur (1968) angegebenen Ausdehnungsfaktoren korrigiert. Die korrigierten relativen Absorptionswerte wurden gegen die Temperatur aufgetragen.

2.2.4 Analytische CsCl Zentrifugation

Die Gleichgewichtsdichtegradientenzentrifugation wurde in der analytischen Ultrazentrifuge von Beckman, Modell E, in neutralem CsCl durchgeführt. Als Marker DNA diente Micrococcus lysodeikticus DNA mit der Dichte 1,725 g/cm^3. Das verwendete CsCl war CsCl-Suprapur von Merck. Für jeden Gradienten wurden 0,2 A_{260}-Einheiten DNA in 400 µl Wasser gelöst und mit CsCl mit Hilfe eines Refraktometers auf den Brechungsindex 1,4000 eingestellt.

2.2.5 Denaturierung und Renaturierung

Die DNA-Proben wurden für die Renaturierungsversuche mittels Ultraschallbehandlung (20 x 5 Sekunden mit einem Branson Sonifier, Stufe 5) auf eine Größe von 400 Nukleotiden gebracht. Die Denaturierung der verschiedenen DNA-Proben und ihre anschließende Renaturierung wurden in einer Lösung von 0,75 M NaCl, 0,075 M Natriumcitrat und 0,2 % SDS in 50 % Formamid durchgeführt. Die Hyperchromizität der Lösung wurde mit dem Spektralphotometer Acta CII mit T_m-Zusatzgerät bei 270 nm unter Verwendung von Küvetten mit 1 mm Lichtweg aufgenommen. Zur Denaturierung wurde,wie bei der T_m-Wertbestimmung beschrieben, die DNA schnell auf 70° C erhitzt, diese Temperatur 15 Minuten lang beibehalten und dann schnell auf die Renaturierungstemperatur von 30° C abgekühlt.Als Reaktionsbeginn wurde der Zeitpunkt angenommen, an dem die Temperatur T_m-10° C unterschritten hatte. Nach erfolgter Renaturierung wurde jede Probe nochmals geschmolzen, um den T_m-Wert zu überprüfen und um zu kontrollieren, daß keine Verluste durch Verdampfen von Flüssigkeit eingetreten waren.

Der Anteil noch denaturierter DNA wurde durch Division der jeweiligen Hypochromizität durch die Hypochromizität bei vollständiger oder nahezu vollständiger Renaturierung berechnet.

Die Absorption bei totaler Denaturierung wurde durch Abzug der Kollapshypochromizität korrigiert (Firtel and Bonner, 1972).

Die ermittelten Renaturierungsprozentsätze wurden gegen den Cot-Wert aufgetragen und die Renaturierungskurven nach Laird und Mac Carthy (1969) ausgewertet.

Zur Ermittlung der Komplexität der aus der Kurve erkennbaren DNA-Fraktionen wurden ihre ermittelten Cot/2-Werte mit dem Cot/2-Wert einer in demselben Puffer renaturierten viralen DNA (T4-Phagen DNA) verglichen.

$$\text{Komplexität (Probe)} = \frac{\text{Komplexität (Standard)} \times \text{Cot/2(Probe)}}{\text{Cot/2 (Standard)}}$$

2.2.6 Korrektur der Komplexität der intermediären Sequenzen

Die Korrektur der infolge Basenfehlpaarung zu hoch eingeschätzten Länge der intermediären Sequenzen wurde nach Sutton und Mc Gallum (1971) durchgeführt:

$$\log \frac{\text{Cot/2 bei perfekter Basenpaarung}}{\text{Cot/2 experimenteller Wert}} = n \log (1 - p)$$

n: Zahl der Basen des Bindungskerns
z.B. 13 ± 2 bei 60° C; 18 ± 3 bei 70° C

Die Renaturierung von Calliphora-DNA wurde bei 22° C in 50 % Formamid durchgeführt. Ohne Formamid würde das einer Temperatur von 58° C entsprechen.

$$n = 13$$

p: Anteil der Basenfehlpaarung

1,5 % Basenfehlpaarung senken den Tm-Wert um 1° C. Durch den Vergleich der Tm-Werte vor und nach der Renaturierung kann so der Anteil der Basenfehlpaarung ermittelt werden.

Tm-Wert der nativen gescherten DNA im Renaturierungsmedium: 55° C (Mittelwert) Tm-Wert der renaturierten intermediären DNA-Fraktion: 43,3° C

Tm-Wertsenkung: 12,2° C

Basenfehlpaarung: 1,5 x 12,2 = 18,3 %

p = 0,183

Cot/2 (Puppen DNA, intermediate Fraktion: 0,133 (Mol x Sek. x l^{-1})

$$\log \frac{\text{Cot/2 bei perfekter Basenpaarung}}{\text{Cot/2, experimenteller Wert}} = 13 \log (1-0,183)$$

Cot/2 bei perfekter Basenpaarung = 0,1023 (MolxSekxl^{-1})

2.2.7 Isolation von unique DNA

Gereinigte, ultraschallbehandelte DNA wurde in Puffer A gelöst, 10 Minuten lang bei 100° C denaturiert und schnell auf 55° C abgekühlt. Die DNA wurde bis zu einem Cot-Wert von 60 (Mol x Sek. x L^{-1}) renaturiert und mittels HTP-Chromatographie in unique repetitive Sequenzen getrennt. Die unique DNA wurde mit 0,18 M Phosphatpuffer (pH 6,8) eluiert, gegen 2 x 1 l destilliertes Wasser dialysiert und mit Äthanol gefällt.

2.2.8 DNA-Jodierung

DNA wurde nach der Methode von Orosz und Wetmur (1974) jodiert. Das Reaktionsgemisch enthielt in einem Volumen von 2 ml: 10^{-5} M KJ; 3 mCi trägerfreies (^{125}J) Jodid (NaJ); 0,1 M/0,04 M NaAc/HAc (pH 5,0); 5 x 10^{-4} M $TICl_3$ und 20 µg zu jodierende Calliphora DNA, die vorher 5 Minuten lang bei 100° C denaturiert worden war. Die Lösung wurde bei 60° C 30 Minuten lang inkubiert und dann schnell auf 4° C abgekühlt. Die jodierte DNA wurde über eine Sephadex-G 25 Säule (1 x 27 cm) aus dem Reaktionsgemisch abgetrennt. Die markierte DNA aus dem

Leervolumen wurde gepoolt und bei 60° C fünf Stunden lang gegen einen Puffer aus 0,4 M NaCl, 15 mM Na_2PO_4 und 2 mM NaETDA - NaOH (pH 6,0) dialysiert, um instabile Nebenprodukte der Jodierungsreaktion zu entfernen. Die ^{125}J-DNA wurde dann 12 Stunden lang bei 4° C gegen Wasser dialysiert, lyophilisiert und in Hybridisationspuffer gelöst. Die spezifische Aktivität betrug bei der Gesamt-DNA 3,9 x 10^6 cpm/µg und bei der unique DNA 5,55 x 10^6 cpm/µg.

2.2.9 Isolierung von RNA

Die in den Hybridisationsversuchen verwendete RNA wurde aus den Fettkörpern von 5 Tage alten Larven und von weißen Vorpuppen nach der von Scheller und Karlson (1977) beschriebenen Methode isoliert. Drei Stunden vor der Präparation des Fettkörpers wurde jedes Tier mit 20 ng Ecdysteron in 5 µl Insektenringer injiziert, während den Kontrolltieren 5 µl Insektenringer injiziert wurde. Das Ecdysteron (ß-Ecdyson) stammte von Rohto, Osaka, Japan).

500 Fettkörper wurden unter flüssigem Stickstoff in einer Mischung von 125 ml eines pH 7,6 Puffers (50 mM Tris HCl; 10 mM NaEDTA; 0,1 M NaCl; 0,5 % SDS; 0,5 % Laurylsarcosinat; 200 µg/ml Heparin) und 125 ml Phenollösung (9 Teile Phenol, 1 Teil pH 7,6 Puffer) zermörsert und 10 Min.lang gerührt.

Das Homogenat wurde bei 20.000 g und 0° C zehn Minuten lang zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und die Phenol- und Interphase mit einem pH 9,0 Puffer (entspricht dem pH 7,6 Puffer) reextrahiert und nochmal zentrifugiert. Die vereinigten Überstände wurden mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (49:49:2) extrahiert und bei 24.500 g 20 Minuten lang zentrifu-

giert. Die obere Phase wurde mit Chloroform extrahiert und bei 1.000 g 10 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde 0,24 M an Ammoniumacetat gemacht und die RNA mit 2,5 Volumen Äthanol über Nacht gefällt.

Nach 30 Minuten Zentrifugation bei 6.000 rpm wurde das Pellet in 90 %igem Äthanol gewaschen, unter Stickstoff getrocknet und in 0,05 M Phosphatpuffer (pH 6,8) gelöst. Nach Zugabe von 5 mM $MgSO_4$ wurde die Lösung mit 20 µg/ml DNase (RNase frei) 10 Minuten lang bei Zimmertemperatur inkubiert.

Nach Zugabe von 0,1 % SDS wurde die Lösung eine Stunde lang bei Zimmertemperatur mit 0,5 mg/ml vorinkubierter Pronase (2 Stunden bei 37° C in Puffer A) inkubiert. Durch Extraktionen mit Chloroform und mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (49:49:2) wurden die Proteine entfernt. Die RNA wurde mit 2 Volumen Äthanol gefällt und mit 70 %igem Äthanol gewaschen.

2.2.10 Isolierung von Poly(A) RNA

Gesamt-RNA wurde in hohem Salzpuffer (0,5 M NaCl; 0,1 M Tris pH 7,4) gelöst und auf eine mit demselben Puffer equilibrierte poly(U) Sepharosesäule gegeben. Nachdem der nicht poly(A)-haltige RNA-Anteil mit hohem Salzpuffer ausgewaschen war, wurde die poly(A) RNA mit Elutionspuffer (0,1 M Tris, pH 7,4) eluiert (Vassart, Brocas, Nokin und Dumont, 1973). Das Eluat wurde 12 Stunden lang gegen drei Portionen von je 1 l Wasser dialysiert, dann gefällt, getrocknet und in dem entsprechenden Puffer gelöst.

2.2.11 DNA-RNA Hybridisierung

Der Hybridisierungspuffer enthielt in einem Volumen von

250 µl die jeweilige Menge RNA und
a) 0,064 µg ^{125}J-DNA ($2,5 \times 10^5$ cpm) bei der Hybridisation mit der Gesamt-Fettkörper-RNA.
b) 0,45 µg unique ^{125}J-DNA ($2,5 \times 10^6$ cpm) bei der Hybridisation mit poly(A) RNA.

Die Hybridisationsansätze wurden in Silikonröhrchen 10 Minuten lang auf 100° C erhitzt und dann in ein Wasserbad von 69° C gebracht. Nach verschiedenen Zeiten wurden 10 µl Aliquote entnommen und mit 2,1 ml eines Puffers aus 0,03 M NaAc, pH 4,5; 0,3 M NaCl; 0,03 M $ZnCl_2$ verdünnt und bei -20° C eingefroren.

Zu einem Aliquot von 1 ml dieser Lösung wurden 25 µg denaturierte Kalbsthymus DNA und 150 µg Kälberserumalbumin als Carrier zugesetzt, und die Mischung sofort mit 1 ml Trichloressigsäure gefällt.

Ein zweites Aliquot von 1 ml wurde bei 45° C eine Stunde lang in Gegenwart von Einzelstrangspezifischer Nuklease von Aspergillus oryzae (Vogt, 1973) inkubiert.

Die Menge radioaktiver DNA, die dieser Behandlung gegenüber resistent war, wurde durch Fällung bestimmt. Die Präzipitate wurden auf Glasfiberfiltern (GF/C; Whatman) gesammelt, fünfmal mit 1 M HCl; 0,1 M Tetranatriumpyrophosphat, dann zweimal mit Äthanol gewaschen und getrocknet. Die Radioaktivität wurde mit einer toluolhaltigen Scintillationsflüssigkeit in einem Berthold Scintillation Counter BF 5003 gemessen. Der Anteil der hybridisierten DNA wurde ausgedrückt als das Verhältnis zwischen den Radioaktivitäten des S1-Nuklease behandelten Aliquots und des nicht S1-Nuklease behandelten Aliquots.

2.2.12 Synthese von cDNA

AMV Reverse Transkriptase, ein Geschenk von D.J. Beard, war nach dem Verfahren von Kacian und Spiegelman, 1973, hergestellt. Die cDNA zu verschiedenen Poly(A) RNAs von Calliphora wurde hauptsächlich nach dem von Harrison et al. (1974) beschriebenen Verfahren hergestellt.

0,2 A_{260}-Einheiten der jeweiligen Template RNA wurden in einem Volumen von 100 µl folgender Mischung inkubiert: 20 µg/ml Oligo$(dT)_{12}$; 400 µM dATP, dGTP, dTTP, ^{3}H-dCTP (0,483 Ci/mmole); 1 mg/ml Actinomycin D; 3 mg/ml Kälberserumalbumin; 50 mM Tris-HCl (pH 8,2); 50 mM KCl; 10 mM Dithiothreitol; 5 mM Magnesiumacetat; 30 µg/ml Reverse Transkriptase (in 20 µl 50 %igem Glycerin

0,2 M KH_2PO_4, pH 7,2
2 mM Dithiothreitol
0,2 % Triton X-100)

Das Inkubationsgemisch wurde zwei Stunden lang bei 37° C inkubiert und die cDNA nach Zugabe von 50 µl 0,1 M EDTA und 50 µg E.coli DNA als Carrier über eine Sephadex G-50 Säule (1 x 30 cm) in einem Puffer aus 0,05 M NaCl, 1 mM Hepes, pH 7.0, isoliert.

Die cDNA wurde in einem 5-20 %igem Sucrosegradienten in 0,9 M NaCl, 0,1 M NaOH fraktioniert.

Der Gradient lief 15 Stunden bei 20° C bei 40.000 rpm in einem SW 41 Rotor. Die Fraktionen mit einem S-Wert größer als 4 S, wurden gesammelt, nach Zugabe von Kalbsthymus DNA (70 µg/ml) als Carrier neutralisiert und mit Alkohol gefällt. Das Präzipitat wurde in sterilem Wasser aufgenommen und über eine Säule aus

Sephadex und Chelex 100 gereinigt. Die Eluate wurden lyophilisiert.

2.2.13 Poly(A) RNA - cDNA Hybridisierung

Die entsprechenden Mengen von poly(A) RNA- und cDNA-Lösungen in sterilem, mit Chelex von Schwermetallionen befreitem Wasser wurden auf

0,5 M NaCl
25 mM Hepes (pH 6,8)
0,5 mM EDTA
50 % Formamid

gebracht. Die Hybridisationslösungen enthielten verschiedene RNA-Konzentrationen und pro Meßpunkt (1 µl) ungefähr 1000 cpm cDNA. Portionen von je 1 µl wurden in silikonisierte und mit Diäthylpyrocarbonat behandelte Glaskapillaren eingeschmolzen, 5 Minuten auf 60° C erhitzt, und bei 37° C inkubiert. Beim Hybridisationsabbruch wurde der Inhalt einer Kapillare in 250 µl eines Puffers verdünnt, der

0,07 M Natriumacetat (pH 4,5);
2,8 mM $ZnSO_4$;
0,14 M NaCl;
14 µg/ml hitzedenaturierte Kalbsthymus DNA

enthielt. Diese Verdünnungen wurden bei -20° C aufbewahrt.

Der hybridisierte DNA-Anteil wurde aus dem Verhältnis zwischen doppelsträngig vorliegender DNA und Gesamt-DNA ermittelt. Dazu wurde zu je einem Aliquot von 120 µl der Verdünnungen 5 µl (= 1 µg Protein = 102 Einheiten) S1 Nuklease (hergestellt nach Vogt, 1973) gegeben. Nach einer zweistündigen Inkubation bei 37° C wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 µl 10 %iger TCA abgestoppt, 10 µg denaturierte Kalbsthymus DNA zugesetzt und bei 0° C ungefähr 20 Minuten lang stehengelassen. Die Präzipitate wurden über GF/C

Filter (Whatman) abfiltriert, zweimal mit 5 %iger TCA und dann mit Methanol gewaschen, die Filter getrocknet und mit einem toluolhaltigen Scintillationsgemisch gezählt.

Ein zweites Aliquot von je 120 µl der Verdünnung wurde zur Bestimmung des gesamten DNA-Gehaltes jedes Meßpunktes genauso behandelt, ohne daß jedoch S1 Nuklease zugesetzt wurde.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchung der DNA

Voraussetzung für die geplanten Untersuchungen über die Wirkung von Ecdysteron auf die Transkription ist eine genaue Kenntnis der Calliphora-DNA. Da aus der Literatur keine Daten bekannt sind, mußte in entsprechenden Experimenten der GC-Gehalt und die Komplexität von Calliphora-DNA ermittelt werden. Diese Daten fanden Verwendung bei der Isolation von unique DNA und zur Bestimmung der günstigsten Inkubationstemperatur für Renaturierung und Hybridisierung.

Der GC-Gehalt der DNA wurde erstens über den Tm-Wert der DNA und zweitens über die in einer CsCl-Gleichgewichtszentrifugation ermittelte Dichte errechnet.

Zur Ermittlung der Komplexität wurde die Renaturierungskinetik der DNA aufgenommen, deren Kenntnis auch für die Trennung der Calliphora-DNA in unique und repetitive Sequenzen erforderlich war.

In einigen Arbeiten ist über selektive Amplifikation repetitiver DNA einiger Eukaryonten berichtet worden (Gall, 1969; Willie, 1972). Deshalb wurde durch Vergleich der Renaturierungskinetiken von Calliphora DNA verschiedener Entwicklungsstufen untersucht, ob eine eventuell durch Ecdysteron verursachte Genamplifikation zu einer Änderung der Renaturierungskinetik führt.

3.1.1 Schmelzpunktbestimmung

Beim Schmelzen (Denaturieren) einer DNA trennt sich die Doppelhelix in ihre zwei Einzelstränge, was mit einer Änderung der physikalischen Eigenschaften der DNA-

Lösung, wie Viskosität, Lichtstreuung und optischer Dichte zusammenfällt (Marmur, Rownd und Schildkraut, 1963). Am einfachsten läßt sich die thermische Denaturierung über die leicht messbare Hyperchromizität am Absorptionsmaximum der DNA, bei 260 nm verfolgen. Die Temperatur in der Mitte dieses Überganges ist der Tm-Wert (mittlere thermische Denaturierungstemperatur).

Der Schmelzpunkt einer DNA ist abhängig von der Ionenstärke des Lösungsmittels und von der Art der Kationen. Um zu vergleichbaren Werten zu kommen, wird normalerweise ein Standardlösungsmittel zur Ermittlung von Schmelzpunkten verwendet.[1]

Die Schmelzpunktbestimmungen bei Calliphora wurden mit nativen ungescherten[2] DNA-Proben von zwei Tage alten Puppen, 4 und 5 Tage alten Larven und mit einer nativen, gescherten Puppen-DNA durchgeführt.

Zur Ermittlung des Tm-Wertes wurde die beim Schmelzen steigende optische Dichte der DNA-Lösung gemessen und gegen die Temperatur aufgetragen.

[1]Als Standardlösungmittel für Tm-Wertbestimmungen wird eine Lösung von 0,15 M NaCl, 0,015 Natriumcitrat (pH 7,0) (=Puffer A) benutzt.

[2]Die langen DNA-Moleküle werden leicht durch Scherkräfte in Bruchstücke zerlegt. Präparationen, die möglichst wenig der Scherung ausgesetzt waren, werden im Folgenden kurz als "ungeschert" bezeichnet.

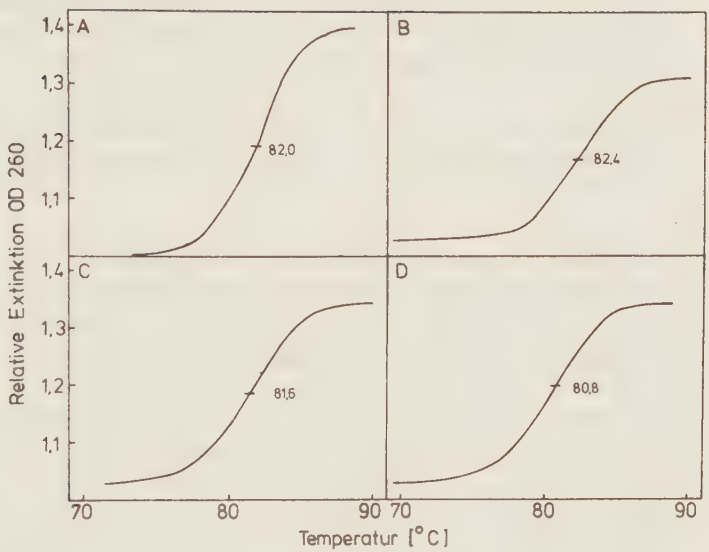

Abb. 1 Optische Schmelzprofile nativer, ungescherter DNA-Proben von
A) Puppen-DNA
B) DNA aus 5 Tage alten Larven
C) DNA aus 4 Tage alten Larven
und einer nativen, aber gescherten DNA-Probe von
D) Puppen-DNA.

Es ergaben sich die in Abb. 1 dargestellten Schmelzkurven. Die ermittelten Tm-Werte der nativen, ungescherten DNA-Proben, liegen mit
82,0° C für Puppen-DNA,
82,4° C für DNA aus 5 Tage alten Larven und
81,6° C für DNA aus 4 Tage alten Larven
so dicht zusammen, daß man unter den gegebenen experimentellen Bedingungen von einem einheitlichen Tm-Wert sprechen kann. Eine unter denselben Bedingungen durch-

geführte Tm-Wertbestimmung von T4-Phagen-DNA ergab einen Schmelzpunkt von 83,6° C gegenüber dem in der Literatur angegebenen Tm-Wert von 84,0° C.

Der Schmelzpunkt nativer, gescherter Puppen DNA (Abb. 1) liegt mit 80,8° C 1,2° C unter dem ungescherter Puppen-DNA.

Zwischen den Tm-Werten verschiedener DNAs und ihrem GC-Gehalt besteht eine lineare Beziehung.Für DNA, die in Puffer A gelöst ist, ist die Beziehung durch die Gleichung GC = (Tm - 69,3) x 2,44 charakterisiert (Marmur und Doty, 1962). Aus den gemessenen DNA-Schmelzpunkten ergeben sich somit die in Tabelle 1 wiedergegebenen GC-Gehalte.

Tabelle 1

	Tm-Wert	%GC
Puppen-DNA	82,0° C	31
5 d DNA	82,4° C	32
4 d DNA	81,6° C	30

3.1.2 CsCl-Gradientenzentrifugation

Eine weitere Methode, den GC-Gehalt einer DNA zu ermitteln, bietet die Bestimmung der DNA-Dichte im CsCl-Gradienten (Schildkraut et al., 1961).

Die Dichte einer DNA hängt von ihrer Basenzusammensetzung ab und steigt proportional zum GC-Gehalt an. Die empirische Formel

ϱ = 1,660 + 0,098 (GC) (Schildkraut et al., 1961)

wird oft gebraucht, um aus der Dichte die Basenzusammensetzung einer doppelsträngigen DNA abzuleiten. Hierbei

stellt ρ die Dichte in g/cm^3 und (GC) den molaren Anteil von Guanin plus Cytosin dar. Die CsCl-Gradientenzentrifugation ist zeitsparend und kommt mit kleinen Mengen aus. Während bei einer Tm-Wertbestimmung 30-50 µg hochgereinigte DNA gebraucht werden, wird für eine Dichtebestimmung ungefähr 8 µg DNA benötigt.

Bei Calliphora-DNA wurde die Dichte der DNA von 4 Tage alten Larven in einem neutralen CsCl-Gradienten zu 1,689 g/cm^3 bestimmt. Die DNA sedimentierte in einem scharfen Peak. Aus der gemessenen Dichte von 1,689 g/cm^3 läßt sich mit der oben angegebenen Formel ein GC-Gehalt von 29,6 % berechnen.

3.1.3 Renaturierungsexperimente

Unter Renaturierung von DNA versteht man die Reassoziation der durch denaturierende Einflüsse voneinander getrennten komplementären Einzelstränge einer DNA zu Doppelsträngen. Bei der Kollision zweier komplementärer Stränge mit der anschließenden "zippering reaction" (Wetmur and Davidson, 1968) handelt es sich um eine Reaktion 2. Ordnung. Die Menge an denaturierter DNA sollte sich dabei nach folgender Gesetzmäßigkeit vermindern:

$- dC/dt = k_2 C^2$ $\quad$ C = Konzentration der denaturierten DNA

t = Renaturierungszeit

Nach Integration ergibt sich:

$C/C_o = 1/1 + k_2 C_o t$ $\quad$ C_o = Anfangskonzentration der denaturierten DNA

Die dieser Gleichung gehorchende ideale Cot-Kurve ist symmetrisch und gilt für DNAs, die nur aus einer Komponente bestehen, wie Bakterien- oder Viren-DNA.

Nach Britten und Kohne (1968) und Wetmur und Davidson (1968) hängt die Reaktionsrate der Renaturierung von der Genomgröße und der Homologie im Genom eines Organismus ab. Je komplexer ein Genom ist, desto geringer wird der Anteil einer einzelnen Sequenz innerhalb der Gesamt-DNA und umso länger wird die Renaturierungszeit.

Britten und Kohne (1968) führten das Produkt aus DNA-Konzentration und Inkubationszeit (Cot) als Parameter ein, der das Ausmaß der Renaturierungsreaktion kontrolliert.

$$\text{Cot} = \text{Mol} \times \text{Liter}^{-1} \times \text{Sekunden}$$

Bei der Renaturierung einer Bakterien- oder Viren-DNA wird nach Britten und Kohne (1969) ein Cot-Bereich von 100 überstrichen. Während die DNAs von Viren und Bakterien aus einer Komponente bestehen, besitzen eukaryotische DNAs mehrere Komponenten:

1. einen schnell renaturierenden, aus kurzen Sequenzen bestehenden und vielfach wiederholt vorkommenden Anteil,
2. einen langsam renaturierenden Anteil, der aus längeren, singulären (unique) Sequenzen besteht, und
3. einen Anteil mit Sequenzen mittleren Wiederholungsgrades.

Bei der Reassoziation einer solchen aus mehreren Komponenten zusammengesetzten DNA wird ein Cot-Bereich von mehr als 100, bei Calliphora-DNA ungefähr 10^5, überstrichen.

Als Cot/2-Wert bezeichnet man den Cot-Wert, der erreicht ist, wenn 50 % der denaturierten DNA renaturiert ist. Dieser Wert charakterisiert die Komplexität einer DNA.

Unter Komplexität einer eukaryotischen DNA-Präparation versteht man die Anzahl der Nukleotidpaare der längsten,

sich nicht wiederholenden Sequenzen. Der Cot/2-Wert und die Komplexität sind proportional:

$$\text{Komplexität} = K \; Cot/2$$

Gebräuchliche Inkubationsbedingungen für die Renaturierung waren 0,18 M Ionenstärke, eine Inkubationstemperatur von 60° C und eine Fragmentgröße von 500 Nukleotiden.

Die Teile des Genoms, die langsam, mittelmäßig und schnell renaturierenden Komponenten zugeschrieben werden, sind normalerweise die einer Reaktion bei der optimalen Renaturierungstemperatur von 25° C unter dem Tm-Wert (Britten und Kohne, 1968), hängen aber noch von den weiteren Inkubationsbedingungen wie pH und Ionenstärke ab und repräsentieren keine absolute Einteilung des Genoms (Mc Carthy and Church, 1970). Eine Renaturierung bei hoher Ionenstärke (0,95 M Na^+) und Tm-Senkung durch Formamid beschleunigt die Renaturierungsreaktion (Mc Conaughy, Laird and Mc Carthy, 1969).

Um die erhaltenen Werte nicht auf Grund verschiedener Inkubationsbedingungen auf Standardinkubationsbedingungen umrechnen zu müssen, wird meist eine DNA mit bekannter Genomgröße (bakterielle oder virale DNA) und ähnlichem GC-Gehalt parallel renaturiert und mit Hilfe der Beziehung zwischen Komplexität und Cot/2-Wert von den Werten der bekannten DNA auf die Komplexität der untersuchten DNA geschlossen.

Die gebräuchlichsten Methoden zur Verfolgung einer Renaturierungsreaktion sind:

a) die Verfolgung der mit zunehmender Strangpaarung abnehmenden optischen Dichte,
b) die Auftrennung des DNA-Gemisches in Einzel- und

Doppelstränge mit Hilfe der Hydroxylapatitaffinitätschromatographie,

c) die Verdauung von Einzelsträngen durch S1-Nuklease und das Fällen der übriggebliebenen Doppelstränge.

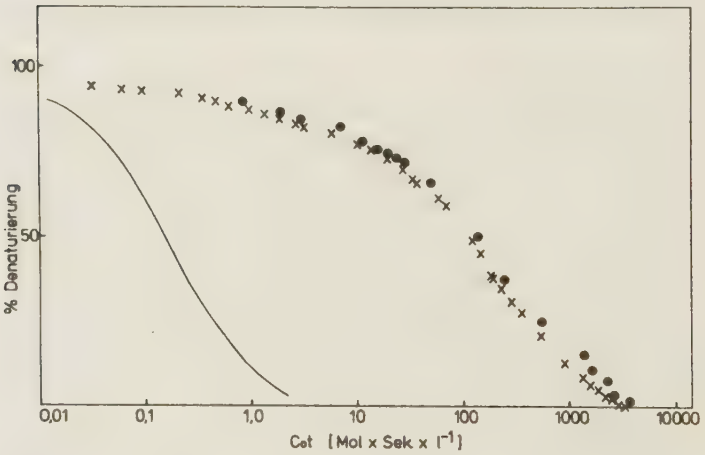

Abb. 2 Optische Cot-Darstellung von Calliphora Gesamt-DNA-Renaturierungen

× 1,07 $A_{260\text{-}U}$/ml Puppen-DNA
19,45 $A_{260\text{-}U}$/ml Puppen-DNA
• 25,00 $A_{260\text{-}U}$/ml 5 Tage Larven DNA
\- 0,40 $A_{260\text{-}U}$/ml T4-Phagen-DNA

Renaturierungen wurden in 50 % Formamid, 0,75 NaCl, 0,075 M Natriumcitrat und 0,2 % SDS bei 22° C durchgeführt.

In Abb. 2 sind die Renaturierungskurven von Gesamt-Puppen-DNA und Gesamt-DNA aus 5 Tage alten Larven wiedergegeben, sowie die Renaturierungskurve der ebenfalls in demselben Medium renaturierten Vergleichs-DNA von T4-Phagen, für die sich hier ein Cot/2-Wert von 0,152 Mol x Sek. x l^{-1} ergab.

Bei der Ermittlung der Renaturierungsprozentsätze muß beachtet werden, daß ein Teil der Hyperchromizität beim Abkühlen von der Denaturierungstemperatur auf die Renaturierungstemperatur wieder zurückgeht. Man bezeichnet diese Absorptionsverringerung, die durch "Basestacking" zustandekommt, als Kollapshyperchromizität. Sie wurde bei Calliphora bei unique DNA ermittelt und macht 3,4 % der Absorption bei totaler Denaturierung aus.

In den Cot-Kurven sind die Renaturierungsprozentsätze gegen die jeweiligen Cot-Werte aufgetragen. Es zeigt sich ein Renaturierungsverlauf, der sich über 10^5 Cot-Werte hinzieht; daraus ist zu schließen, daß auch Calliphora-DNA aus mehreren Komponenten zusammengesetzt ist. Der Anteil der Komponenten an der Gesamt-DNA wurde aus dem Verlauf der Renaturierungskurve nach dem von Laird und Mc Carthy (1969) geschilderten Verfahren errechnet. Dazu wird die Renaturierungskurve in mehrere Fraktionen zerlegt, die auf 100 % normiert und mit der theoretischen Kurve verglichen werden, die der Gleichung $C/C_o = 1/1 + kC_o t$ gehorcht. Die größte Übereinstimmung ergab sich bei einer Einteilung in 80 % langsam, 14 % mittelmäßig schnell und 6 % schnell renaturierende Sequenzen (Abb. 3), und zwar sowohl bei Puppen-DNA als auch bei der DNA von 5 Tage alten Larven.

Kurve A zeigt die Renaturierung der intermediären, Kurve B die der unique Sequenzen. Die beiden auf 100 % normierten Fraktionen sind der Puppen-DNA-Renaturierungskurve (Abb. 2) entnommen. Die gemessenen und korrigierten Cot/2-Werte der einzelnen Fraktionen sind in Tabelle 2 wiedergegeben.

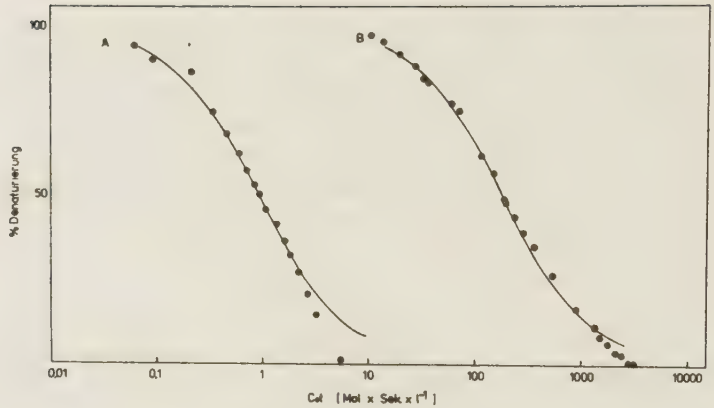

Abb. 3 Normierung der unterschiedlich schnell renaturierenden Sequenzen der Puppen-DNA auf 100%:
Kurve A: Mittelmäßig schnell renaturierende Sequenzen,
Kurve B: langsam renaturierende Sequenzen.
Die durchgezogene Linie stellt die theoretische Kurve dar.

Zur Charakterisierung der Qualität der bei der Renaturierung basengepaarten Strukturen ist die Bestimmung ihrer thermischen Stabilität geeignet (Mc Carthy and Mc Conaughy, 1968). Sie wurde exemplarisch bei der DNA von 5 Tage alten Larven vor und nach der Renaturierung gemessen (Abb. 4). Bei der Tm-Wertbestimmung nativer gescherter DNA ergab sich in dem Medium 50 %Formamid; 0,75 M NaCl; 0,075 M Natriumcitrat; 0,2 % SDS ein Tm-Wert von 56,1° C. Geht man von einem Tm-Wert von 80,8° C in 0,15 M NaCl; 0,015 M Natriumcitrat aus, so ergibt sich für das Inkubationsmedium ein theoretischer Tm-Wert von 54° C[1], ein Wert, der somit sehr nahe am tat-

[1]50 % Formamid senken den Tm-Wert um 36° C. Durch die hohe Ionenstärke wird der Tm-Wert um 9,5° C erhöht (gegenüber Puffer A).

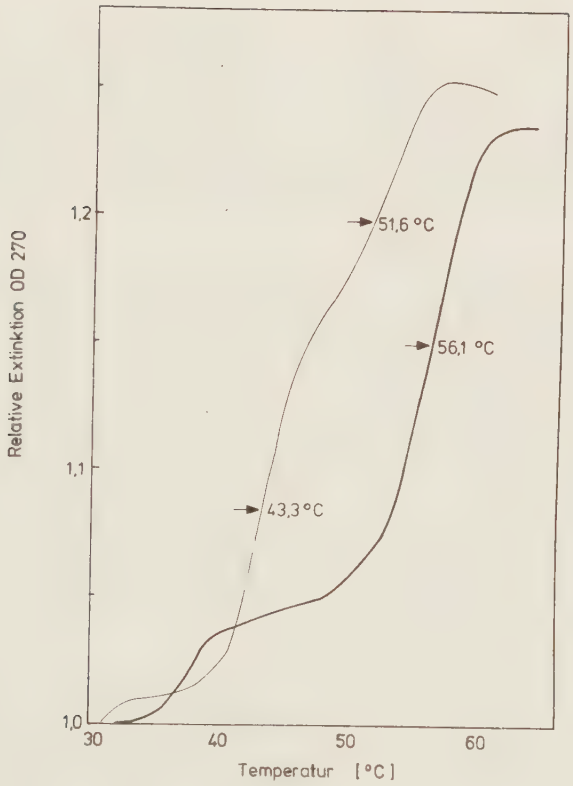

Abb. 4 Vergleich der optischen Schmelzpunktprofile von nativer, zerkleinerter DNA von 5 Tage alten Larven und von derselben DNA nach der Renaturierung in 50 % Formamid, 0,75 M NaCl, 0,075 M Natriumcitrat und 0,2 % SDS bei 22° C.

——— native DNA, geschert

– – – – renaturierte DNA, geschert

sächlich gefundenen Wert von 56,1° C liegt. Das Schmelzprofil der renaturierten 5 Tage DNA ist zweiphasisch und läßt den Schluß zu, daß ein Teil der DNA, wahrscheinlich die intermediate Sequenzen bei 43,3° C, ein anderer Teil, wahrscheinlich unique Sequenzen bei der Temperatur von 51,6° C schmilzt.

Die Fraktion der DNA mit mittelmäßig schnell renaturierter DNA, die intermediäre Fraktion, besteht aus DNAs, die nicht genau komplementär sind, sondern von verwandten Sequenzen abstammen und so einander nur ähnlich sind. Das führt bei der Renaturierung zu Basenfehlpaarung und damit zu einer zu hohen Einschätzung der Länge der repetitiven Einheit. Nach Sutton und Mc Gallum (1971) kann man die Komplexität mittelmäßig schnell renaturierender Sequenzen wie unter Methoden beschrieben korrigieren. Diese korrigierten Werte sind in Tabelle 2 für die intermediären Sequenzen angegeben.

Zur Charakterisierung der DNA kann man somit feststellen, daß sich für die Gesamt-DNA bei einem Tm-Wert von 81,6-82,4° C ein GC-Gehalt von 30-32 % errechnen läßt, während sich aus der Dichte im neutralen CsCl-Gradienten von 1,689 g/cm^3 ein GC-Gehalt von 29,6 % ergibt.

Bei der Renaturierung zeigen beide untersuchten DNA-Sorten die gleiche prozentuale Aufteilung des Genoms in unterschiedlich schnell renaturierende Sequenzen: 80 % langsam, 14 % mittelmäßig schnell und 6 % schnell renaturierende Sequenzen.

Tabelle 2

Fraktion	Prozentsatz des Genoms	Cot/2 gemessen	Cot/2 rein	korrigierter Cot/2-Wert der Intermediär-Fraktion (nach Sutton und Mc Gallum, 1971)	Wiederholungsfrequenz ***	Komplexität (Dalton)
PUPPEN-DNA						$1,54 \times 10^{11}$
langsam-	80	180	144		1	$1,23 \times 10^{11}$
mittelmäßig schnell-	14	0,95	0,133	0,1023	190	$8,75 \times 10^{7}$ **
schnell renaturierende Sequenzen	6					
5 TAGE LARVEN DNA						$1,88 \times 10^{11}$
langsam-	80	220	176		1	$1,5 \times 10^{11}$
mittelmäßig schnell-	14	1,6	0,224	0,1731	137	$1,47 \times 10^{8}$ **
schnell renaturierende Sequenzen	6					
T4-DNA *		0,152				$1,3 \times 10^{8}$

Zu Tabelle 2: *Die Genomgröße von T4-Phagen-DNA beträgt nach Wetmur, Davidson (1968) $1,3 \times 10^8$ Dalton.

**Die für die Komplexität der intermediären Sequenzen angegebenen Werte sind aus den nach Sutton und Mc Gallum korrigierten Cot/2-Werten errechnet.

***Die relative Häufigkeit von Sequenzen verschiedener Komponenten einer Mischung ist umgekehrt proportional zu ihren unkorrigierten Cot/2-Werten.

3.2 Hybridisierungen

Nach den notwendigen DNA-Untersuchungen wurde in Hybridisierungen von
1. gesamter Fettkörper-RNA mit gesamter Puppen-DNA,
2. poly(A) RNA mit unique Puppen-DNA und
3. poly(A) RNA mit der jeweiligen cDNA

die Abhängigkeit der RNA-Zusammensetzung vom Entwicklungsstadium und von Ecdysteronbehandlung überprüft.

Während Hybridisierungen von Gesamtnukleinsäuren einen Anhaltspunkt für eine veränderte RNA-Zusammensetzung geben, kann man bei der Hybridisierung von poly(A) RNA mit unique DNA zwar feststellen, ein wie großer Teil des Genoms im jeweiligen Entwicklungsstadium für poly(A) RNA transkribiert, aber die Komplexität und relative Häufigkeit der Transkripte kann erst durch Hybridisierung einer poly(A) RNA gegen ihre eigene cDNA ermittelt werden.

Hybridisierungen sind ebenso wie Renaturierungen von der Konzentration der komplementären Nukleinsäuresequenzen und von den Inkubationsbedingungen abhängig, wenn auch in etwas anderem Maße. Mit den Hybridisierungen sollte abgeschätzt werden, welcher relative Anteil des Genoms für eine RNA-Präparation kodiert hat, und wie eine RNA-Population zusammengesetzt ist. Dazu ist es nötig, mit einem hohen RNA-Überschuß zu hybridisieren, um alle komplementären Basensequenzen der DNA abzusättigen, auch solche, die nur in niedriger Konzentration vorliegen.

Voraussetzung für eine quantitative Aussage ist eine DNA mit hoher spezifischer Radioaktivität. Da diese nicht durch Markierung in vivo erreicht werden konnte, wurde die DNA in vitro mit ^{125}J zu hoher spezifischer Aktivität markiert. Bei einer Hybridisierung auf Nitrocellulosefiltern hybridisieren nur repetitive DNA-Sequenzen. Deshalb muß die Reaktion, um auch unique-DNA-Sequenzen zu erfassen, in Lösung ausgeführt werden. Zur Korrektur der ermittelten Werte wegen der DNA-DNA Eigenhybridisierung wurde in einer Parallelrenaturierung ^{125}J-DNA allein inkubiert und der Renaturierungsprozentsatz von den in den RNA-DNA Hybridisierungen ermittelten Prozentsätzen hybridisierter DNA abgezogen.

Zur Ermittlung der Hybridisierungsprozentsätze wurde die unterschiedliche Wirkung von S1 Nuklease auf Einzel- und Doppelsträngige Nukleinsäuren ausgenutzt. Die während der Hybridisierung einzelsträngig gebliebenen Nukleinsäuren werden von S1 Nuklease abgebaut, während die doppelsträngigen Hybride nicht angegriffen werden und nach Zugabe eines Carriers auf Glasfaserfilter gefällt werden können.

3.2.1 Jodierung der DNA

Die Jodierung der DNA wurde nach dem Verfahren von Orosz und Wetmur (1974) durchgeführt, bei dem die Degradation trotz hoher Jodierung niedrig bleibt. Die bei den Jodierungsansätzen erreichten Aktivitäten waren bei Gesamt-DNA 3,9 x 10^6 cpm/µg und bei unique DNA 5,5 x 10^6 cpm/µg.

Die Größe der ^{125}J-DNA wurde mittels Polyacrylamidgelelektrophorese bestimmt. Wie von Orosz und Wetmur beschrieben, änderten sich die elektrophoretischen Eigenschaften der beschallten DNA durch die Jodierung nicht (Abb. 5).

Die Qualität der jodierten DNA wurde durch Vergleich der Renaturierung von jodierter und unjodierter DNA geprüft. In Abb. 6 kann man sehen, daß beide DNAs in Puffer A (0,195 M Na^+) bis zu einem Cot von 50 (Mol x Sek. x l^{-1}) mit derselben Geschwindigkeit reassozieren. Erst bei höheren Cot-Werten war die Reaktionsrate der jodierten DNA geringer. 76 % der ^{125}J DNA ist bei einem Cot von 1000 (Mol x Sek. x l^{-1}) renaturiert, während von der nichtjodierten DNA nach dieser Zeit 96 % renaturiert sind.

3.2.2 Hybridisierung von Gesamt-Nukleinsäuren

Der Teil der DNA-Sequenzen, der in einer Gesamt-RNA transkribiert vorliegt, kann durch Hybridisierung der gesamten Zell-RNA mit der Gesamt-DNA identifiziert werden. Zunächst wurde die Fettkörper-Gesamt-RNA von fünf Tage alten, mit Ecdysteron behandelten Larven mit RNA von unbehandelten Kontrolltieren in Bezug auf ihre Hybridisierungsfähigkeit mit Gesamt-DNA verglichen.

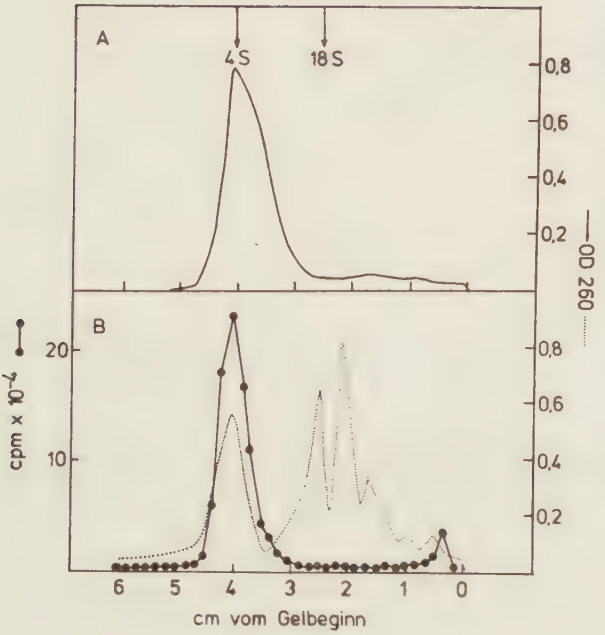

Abb. 5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese von DNA vor und nach der Markierung mit ^{125}J.

———— Unique DNA von einem Tag alten Puppen vor der Jodierung (Abb. 5A).

●———● Unique DNA nach der Jodierung (Abb. 5B) (Beide DNAs waren mit Ultraschall behandelt).

····· Gesamt-RNA von weißen Vorpuppen als Marker.

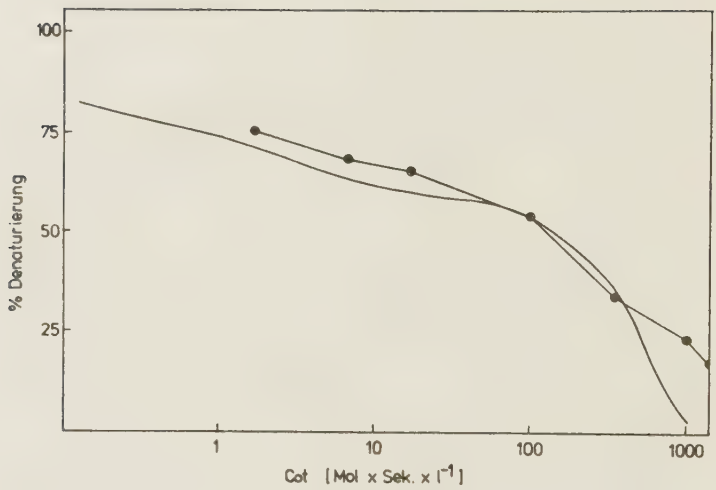

Abb. 6 Renaturierung von gescherter DNA aus 9 Tage alten Calliphora erythrocephala in Puffer A (0,195 M Na^+).

———— Unmarkierte DNA (631 µg/ml)

●——● ^{125}J DNA und 1,7 µg/µl unmarkierte DNA

Die Renaturierung wurde bei unmarkierter DNA photometrisch, bei ^{125}J DNA durch Messung der S1 Nuklease resistenten Radioaktivität bestimmt.

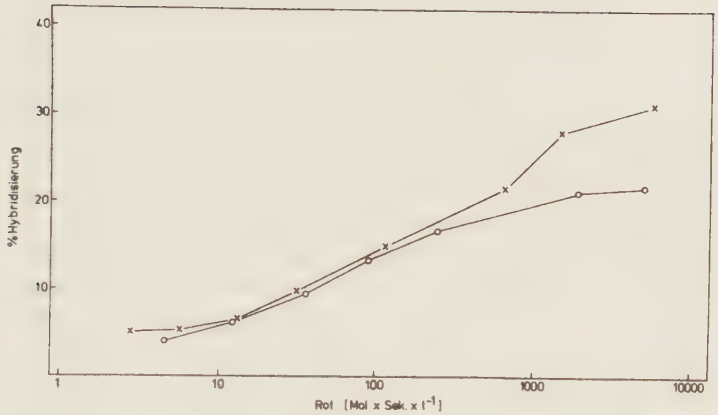

Abb. 7 Hybridisierung jodierter Gesamt-DNA mit einem großen Überschuß von Gesamt-RNA aus
o - o 5 Tage alten Larven (Kontrolle)
x - x 5 Tage alten Larven, die 3 Stunden vor der Präparation der Fettkörper mit jeweils 20 ng Ecdysteron behandelt wurden.
0,06 µg ^{125}J DNA (spez. Aktivität 3,9 x 10^6 cpm/µg) wurde mit 725 µg RNA in einem Volumen von 250 µl hybridisiert.

Abb. 7 zeigt den Reaktionsverlauf.
Die Gesamt-Fettkörper-RNA von 5 Tage alten Larven hybridisierte mit 21,5 % der Calliphora-DNA während die RNA von ecdysteronbehandelten Tieren mit 31 % einen höheren Hybridisierungsprozentsatz erreichte.

3.2.3. Hybridisierung von unique DNA mit poly (A) RNA

Um die unique DNA-Sequenzen von den repetitiven DNA-Sequenzen zu trennen, wurde die ultraschallbehandelte Calliphora-DNA wie in Methoden renaturiert. Abb. 6 zeigt die Renaturierungskurve von Calliphora-DNA in 0,195 M Na^+ (Puffer A). Nach der Renaturierung der repetitiven Sequenzen und vor der Renaturierung der unique Sequenzen zeigt die Kurve zwischen Cot 20 und Cot 70 ein Plateau, das einen Bereich darstellt, in dem nahezu keine Renaturierung stattfindet. Durch Trennung von Doppelstrang (renaturiert) und Einzelstrang läßt sich die noch nicht renaturierte "unique DNA" isolieren.

Da die unique Sequenzen für mRNA kodieren, gibt ihre Isolierung die Möglichkeit,durch eine nachfolgende Hybridisierung mit verschiedenen mRNAs eine Aussage über die Zusammensetzung der mRNAs verschiedener Entwicklungsstufen zu machen. Durch die Hybridisierung von unique DNA mit der poly(A) RNA kann der Anteil der im jeweiligen Stadium exprimierten genetischen Information abgeschätzt werden.

Nach Erreichen von Cot 60 (Mol x Sek x l^{-1}) wurde der Renaturierungsansatz über eine HTP-Säule gegeben und so in 36 % doppelsträngige (repetitive) DNA und 64 % noch einzelsträngige (unique) DNA aufgetrennt. Poly(A) RNA wurde aus Gesamt-RNA durch Affinitätschromatographie über Poly(U) Sepharose isoliert (Material und Methoden). Die Größe so isolierter poly(A) RNA Moleküle bewegt sich, wie durch Polyacrylamidgelelektrophorese gezeigt wurde, zwischen 4 und 22 S (Scheller und Karlson, 1977 b).
Die Hybridisierungszeit war mit 168 Stunden lang ge-

nug, um unter den Reaktionsbedingungen Sättigung zu erreichen. Da die Sättigungswerte nur einen kleinen Prozentsatz der DNA ausmachen, wurde gegenüber der Hybridisierung mit Gesamt-RNA die zehnfache DNA Konzentration und damit die zehnfache Radioaktivität eingesetzt. Die Eigenhybridisierung der unique ^{125}J DNA wurde in einem Parallelexperiment bestimmt und betrug 1,2 %. Dieser Wert wurde von den bei den poly(A) RNA Hybridisierungen mit unique DNA erhaltenen Werten abgezogen.

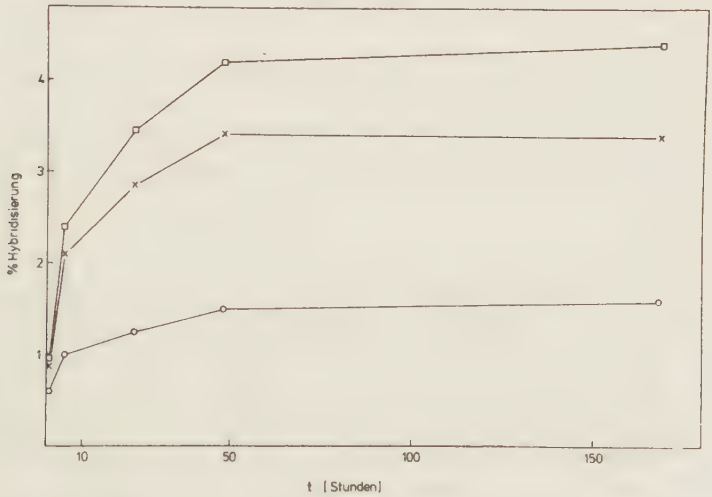

Abb. 8 Hybridisierung von poly(A) haltiger RNA mit unique DNA-Sequenzen.
0,45 µg unique DNA (2,5 x 10^6 cpm) wurden mit 142,5 µg poly(A) RNA aus den Fettkörpern von
o——o 5 Tage alten Larven,
x——x 5 Tage alten Larven, die drei Stunden vor der Fettkörperpräparation mit 20 ng Ecdysteron behandelt wurden,
□——□ weißen Vorpuppen
hybridisiert.

Abb. 8 zeigt, daß die poly(A) RNA vom Fettkörpergewebe von 5 Tage alten Larven mit 1,4 % der unique DNA-Sequenzen des Calliphoragenoms hybridisierte. Die poly (A) RNA von ecdysteronbehandelten Tieren hybridisierte mit 3,4 % der unique DNA-Sequenzen, während poly(A) RNA von weißen Vorpuppen, bei denen der endogene Ecdysontiter sein Maximum hat, sogar mit 4,4 % hybridisierte.

3.2.4 Hybridisierung von poly(A) RNA gegen die eigene cDNA

In dieser Arbeit wurden die Komplexität und Häufigkeitsverteilung von poly(A) RNA aus den Fettkörpern von Calliphora erythrocephala zweier Entwicklungsstufen durch Hybridisierung mit ihren cDNAs miteinander verglichen.

Die poly(A) RNA besteht aus verschiedenen Sequenzen mit verschiedener Häufigkeit. Man geht von der Annahme aus, daß in der cDNA-Kopie einer poly(A) RNA dieselbe Häufigkeitsverteilung vertreten ist wie in dem Template. Eine Hybridisierung zwischen einem Überschuß von poly (A) RNA und ihrer eigenen cDNA-Kopie entspricht somit der Renaturierung einer radioaktiv markierten DNA mit einem Überschuß unmarkierter DNA. In beiden Fällen sollen alle Sequenzen der markierten Nukleinsäure durch komplementäre Sequenzen abgesättigt werden und zwar mit einer Geschwindigkeit, die der Größe und der Häufigkeit der Sequenzen in der Präparation entspricht. Entsprechend den Renaturierungskinetiken von DNAs läßt sich durch die Hybridisierung von poly(A) RNA mit ihrer eigenen cDNA nicht nur die Zahl verschiedener poly(A) RNA-Sequenzen bestimmen, sondern auch ihre relative Häufigkeit in der poly(A) RNA-Population.

Von den poly(A) RNAs aus a) 4 Tage alten Larven und
b) weißen Vorpuppen
wurden mit Hilfe von gereinigter "Reverser Transkriptase" hochradioaktive cDNAs synthetisiert. Die cDNAs wurden mit einem großen Überschuß von Template RNA hybridisiert und es ergaben sich die in Abb. 9 wiedergegebenen Hybridisierungskurven. Die Kinetiken dieser Reaktion sind unabhängig vom RNA/DNA-Verhältnis, wenn dies größer als 10 ist (Getz et al. 1974).

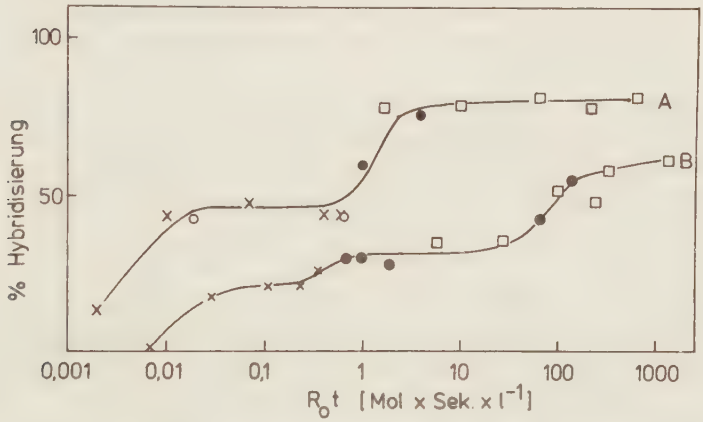

Abb. 9 Hybridisierung von cDNA mit der entsprechenden poly(A) RNA von
A) 4 Tage alten Larven
B) weißen Vorpuppen
Es wurden folgende RNA-Konzentrationen benutzt:
670 µg/ml
67 µg/ml
6,7 µg/ml
0,67 µg/ml

Die Hybridisierung der cDNA von 4 Tage alten Larven gegen ihre Template RNA verläuft über einen Rot-Bereich von vier Größenordnungen. In der Kurve sieht

man zwei große Übergänge, von denen der erste 43 % und der zweite 39 % der poly(A) RNA-Population dieser Entwicklungsstufe ausmacht. Der erste Übergang wird durch vielfach wiederholt vorkommende poly(A) RNA-Sequenzen verursacht, die dementsprechend schnell hybridisieren, während der zweite Übergang durch Sequenzen bestimmt wird, die nicht so häufig in der RNA vertreten sind. Die Kurve erreicht ein Plateau bei 82 % hybridisierter cDNA. Vergleicht man die korrigierten Rot/2-Werte der Übergänge mit dem Rot/2-Wert einer Standard-RNA mit bekanntem Molekulargewicht, so kann man die Zahl der verschiedenen Sequenzen errechnen.

Getz et al. (1974) haben Globin mRNA gegen die cDNA-Kopie hybridisiert und kamen für diese 400 000 D RNA unter gleichen Hybridisierungsbedingungen auf einen Rot/2-Wert von 0,004 Mol x Sek x l^{-1}.

Unter Verwendung dieses Standards ergeben sich für die poly(A) RNA von 4 Tage alten Larven 107 verschiedene RNA-Sequenzen von je 400 000 D (Tabelle 4). Die Hybridisierungskinetik der Vorpuppen-cDNA mit Vorpuppen poly(A) RNA ist komplexer und erstreckt sich über fünf Größenordnungen an Rot-Werten. In dieser Reaktion wurde allerdings ein Plateau erreicht, das bei nur 62 % hybridisierter cDNA liegt. Im Profil ist es schwieriger, die verschiedenen Häufigkeitsklassen der RNA zu unterscheiden.

Es ergeben sich drei Übergänge, in denen 21, 14 und 27 % der cDNA hybridisiert werden. Die Gesamtzahl der Sequenzen von 400 000 Dalton großen RNA-Molekülen liegt bei 6 500 (Tabelle 3).

Tabelle 3 Poly(A) RNA-cDNA Hybridisierungen

Hybridisierte Nukleinsäuren		DNA-Fraktion[1] (Anteil hybridisierter cDNA)	Rot/2 beobachtet	Rot/2[2] korrigiert	Zahl der verschiedenen[3] Sequenzen á 400 000 Dalton	Komplexität[4]
Standard Globin mRNA-cDNA (Getz et al. 1974)		1,0	0,004	0,004	1	4×10^5 Dalton
CALLIPHORA						
4 d poly(A) RNA-cDNA	I	0,43	0,004	0,00172	0,43	$1,72 \times 10^5$ Dalton
	II	0,39	1,1	0,429	107,0	$4,29 \times 10^7$ Dalton
VP poly(A) RNA-cDNA	I	0,21	0,012	0,00252	0,63	$2,52 \times 10^5$ Dalton
	II	0,14	0,48	0,0672	16,8	$6,72 \times 10^6$ Dalton
	III	0,27	95,0	25,65	6412,5	$2,56 \times 10^9$ Dalton
DROSOPHILA[5] (Levy, Mc Carthy)						
	I	0,041	0,064	0,0026	4	
	II	0,38	0,29	0,113	190	
	III	0,22	18,8	4,13	6700	

Zu Tabelle 3:

[1]Die DNA-Fraktion und die Rot/2-Werte wurden den Kurven in Abb. 9 entnommen.

[2]Rot/2 korrigiert = Rot/2 beobachtet x DNA-Fraktion.

[3]Die Zahl der verschiedenen Sequenzen á 400 000 Dalton wird durch Division des korrigierten Rot/2-Wertes durch den Rot/2-Wert einer 400 000 Dalton Standard-RNA (hier globin-mRNA) errechnet: Sequenzzahl = Rot/2 korrigiert / 0,004.

[4]Die Komplexität gibt die Größe einer DNA-Fraktion in Dalton an. Komplexität(einer DNA-Frakt.) = $\frac{\text{Rot/2 korr.}}{\text{Rot/2 Stand.}}$ x Komplexität/Stand. = $\frac{\text{Rot/2 korr.}}{0{,}004} \times 4 \times 10^5 D$

[5]Die Hybridisierung von Drosophila poly(A) RNA - cDNA wurde in 0,024 M Phosphatpuffer; 1 mM EDTA durchgeführt.

Um die Genauigkeit der Basenpaarung auch bei diesen Hybriden zu überprüfen, wurden einige Inkubationsaliquots nach Erreichen des Plateaus auf eine Hydroxylapatitsäule gegeben, die noch einzelsträngige Nukleinsäuren mit 0,14 M äquimolarem Phosphatpuffer (pH 6,8) eluiert, dann die Temperatur auf 55° C erhöht und nach Elution die Temperatur stufenweise jeweils um 5° C erhöht und jedesmal eluiert. Die Radioaktivität der Eluate wurde gemessen und so der Tm-Bereich der Hybride bestimmt (Abb. 10). Bei dem Hybrid aus Nukleinsäuren 4 Tage alter Larven schmilzt der größte Teil in einem Temperaturbereich zwischen 76 und 82° C bei dem Hybrid aus den Nukleinsäuren von Vorpuppen zwischen 70 und 85° C, beides relativ hoch liegende Werte, die auf eine genaue Basenpaarung schließen lassen.

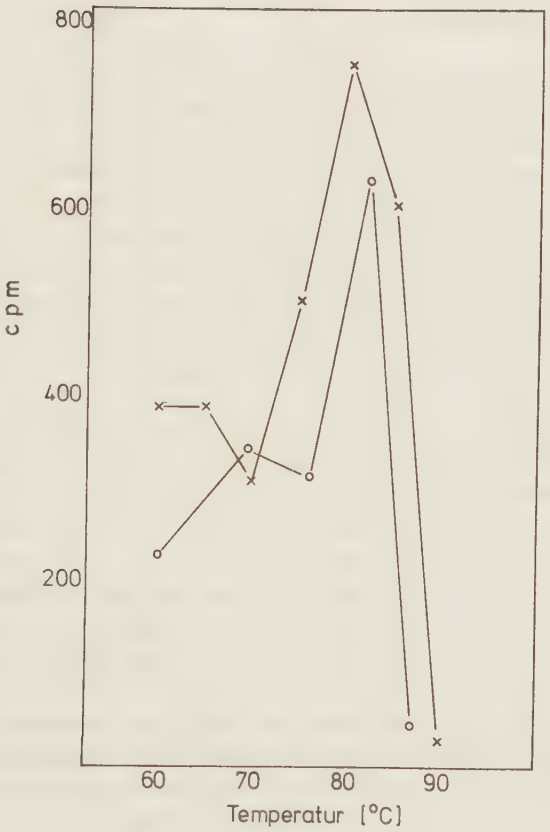

Abb. 10 Bestimmung der Schmelzpunkte der Hybride aus poly(A) RNA und der entsprechenden cDNA. Die poly(A) RNA wurde aus den Fettkörpern von
o——o 4 Tage alten Larven
x——x weißen Vorpuppen
isoliert.

4. Diskussion

Voraussetzung für unter geeigneten Bedingungen durchgeführte RNA-DNA Hybridisierungen ist die Kenntnis von DNA-Eigenschaften wie GC-Gehalt und Renaturierungskinetik. Mit Hilfe des GC-Gehaltes kann man auf den Tm-Wert der DNA schließen, dessen Kenntnis zur Festlegung der Reaktionstemperatur bei den Hybridisierungen wichtig ist. Mit Hilfe der Renaturierungskinetik erhält man Aufschluß über die Komplexität der DNA und ihre Zusammensetzung und kann so bestimmte, bei der Hybridisierung benötigte Sequenzgruppen der DNA isolieren.

Gegenüber den chemischen Methoden zur Bestimmung der Basenzusammensetzung von DNAs hat die Dichtebestimmung im Cäsiumchloridgradienten den Nachteil, daß der GC-Gehalt nur als Summe festgestellt werden kann und nicht der Prozentsatz jeder einzelnen Base. Bis auf wenige Ausnahmen kann man jedoch davon ausgehen, daß der Anteil der beiden Basen an der Gesamt-DNA gleich ist.

Zu einem abweichenden Ergebnis zwischen den durch Tm-Wertbestimmung und den durch Dichtebestimmung ermittelten GC-Prozentsätzen führt die Anwesenheit von "odd bases" in der DNA, was bisher aber nur bei prokaryontischen DNAs beobachtet wurde. Bei Calliphora liegen die auf verschiedene Weise ermittelten GC-Prozentsätze dicht zusammen (Tabellen 1, 4). Sowohl analytische Zentrifugation in Cäsiumchlorid als auch die Tm-Wertbestimmung von Calliphora-DNA ergaben einen mittleren GC-Gehalt von 31 %.

Um Aussagen über die Renaturierungskinetik von Calliphora-DNA machen zu können, wurden als erstes DNA-DNA-Hybridisierungen in Lösung durchgeführt, wobei der

Schmelzpunkt der DNA zur Festlegung der Inkubationstemperatur berücksichtigt wurde.

Bei der Renaturierung kann man die Zusammensetzung der DNA aus verschieden oft wiederholten Sequenzen erkennen. Die am schnellsten renaturierenden Sequenzen kommen innerhalb einer Zelle vielfach wiederholt vor, die am langsamsten renaturierenden wahrscheinlich nur einmal. Dazwischen gibt es eine Gruppe von DNA-Sequenzen mit mittlerem Wiederholungsgrad, die auch mittelmäßig schnell renaturieren.

Wie die Renaturierungsanalyse ergeben hat, enthält Calliphora-DNA 80 % unique Sequenzen, die eine kinetische Komplexität von $1{,}23 \times 10^{11}$ D bei Puppen-DNA und $1{,}5 \times 10^{11}$ D bei DNA aus 5 Tage alten Larven haben.

Während die mRNA Sequenzen aus Bereichen der unique DNA stammen, gehören die Gene für rRNA zu den repetitiven Sequenzen und kodieren nicht für Proteine. Der Prozentsatz der Gene für rRNA kann in der Oogenese vieler Organismen ansteigen und kann auch in somatischen Zellen variieren (Moritz und Roth 1976). Beim Vergleich der Calliphora-DNAs aus 5 Tage alten Larven und 2 Tage alten Puppen zeigt sich allerdings keine Veränderung des Anteils repetitiver Sequenzen.

Vergleiche der Renaturierung in 50 % Formamid, 0,75 M NaCl, 0,075 M Natriumcitrat und der zur Isolierung der unique DNA durchgeführten Renaturierung in 0,15 M NaCl, 0,015 M Natriumcitrat ergeben, daß die Einteilung in langsam, mittelmäßig und schnell renaturierende Sequenzen stark von den Inkubationsbedingungen abhängt und keine absolute Einteilung des Genoms darstellt. Während sich bei der Renaturierung im erstge-

nannten Medium 20 % als repetitive Sequenzen zeigten, waren es in Puffer A 36 % der Gesamt-DNA. Ähnlich unterschiedliche Ergebnisse bei verschiedenen Inkubationsbedingungen hatten Britten und Davidson (1971), Bendich und Mc Carthy (1970) und Laird und Mc Carthy (1968, 1969). Diese Effekte der Inkubationsbedingungen auf die Anteile verschiedener Komponenten eukaryontischer DNA unterstützen die Interpretation, daß die Intermediärfraktion aus Familien besteht, die viele ähnliche Sequenzen umfassen. Die teilweise übereinstimmenden Basensequenzen bewirken eine Hybridisierung der Gesamtsequenzen,obwohl die Einzelstränge nicht in ihrer gesamten Länge komplementär sind. Hierdurch erscheint die Intermediärfraktion größer als sie in Wirklichkeit ist (Mc Carthy und Church, 1970).

Die Reaktion solcher nicht vollständig komplementärer DNA-Stränge bei der Renaturierung der Intermediär-Fraktion zeigte sich bei der Tm-Wertbestimmung der renaturierten Gesamt-DNA von 5 Tage alten Larven (Abb. 4). Ein Teil dieser DNA, der wahrscheinlich den intermediären Sequenzen zuzuordnen ist, schmilzt ungefähr 12° C unter dem Tm-Wert der nativen DNA, was auf eine 18,3%ige Basenfehlpaarung schließen läßt.

In Tabelle 4 sind die aus Renaturierungskinetiken, Schmelzpunktbestimmungen und CsCl-Dichtegradienten gewonnenen Daten verschiedener Dipteren wiedergegeben. Die Renaturierungskinetiken denaturierter Calliphora-DNA zeigen, daß das Genom dieses Organismus wie auch die Genome anderer Dipteren in Bezug auf Nukleotidsequenzhomologien weniger komplex ist als die Genome von Vertebraten, in denen bestimmte Sequenzen 1000-400 000 fach wiederholt vorliegen (Waring und Britten, 1969; Britten und Kohne , 1968). Calliphora-DNA liegt mit einer Genomgröße von $1{,}54 - 1{,}96 \times 10^{11}$ D, das

ist 10-12 mal kleiner als das Mäusegenom mit 2 x 10^{12}D zwischen der Genomgröße der Fleischfliege Sarcophaga bullata und der von Drosophila funebris (Laird und Mc Carthy, 1969).

Die Reaktion zwischen DNA-Einzelsträngen und ihren komplementären RNA-Strängen gehorcht ähnlichen Gesetzen wie die Reaktion zwischen zwei komplementären DNA-Strängen. Die Reaktionsrate und das Reaktionsausmaß hängen wie bei der Renaturierung stark von Temperatur und Inkubationsbedingungen ab. Die "intermediär" als auch "unique" DNA-Fraktion hybridisiert sowohl mit Kern-RNA, als auch mit cytoplasmatischer RNA. Während Hybridisierung mit auf Filtern gebundener DNA nur die intermediäre DNA-Fraktion erfaßt, und die Bedingungen eine relativ hohe Basenfehlpaarung zulassen, ist es mit einem Reaktionsansatz in Lösung möglich,auch die unique DNA-Fraktion zu hybridisieren und durch geeignete Inkubationsbedingungen zu einer geringeren Basenfehlpaarung zu kommen. Aber auch bei der Hybridisierung in Lösung liefert die intermediäre DNA-Fraktion ungenaue Werte, da sie aus einander ähnlichen Sequenzen besteht, die leicht zu einander nicht genau komplementären Doppelsträngen assoziieren. DNA-RNA Hybridisierungen im RNA-Überschuß werden durchgeführt, um verschiedene RNA-Präparate in Bezug auf den Transkriptionsprozentsatz miteinander vergleichen zu können. Alle DNA-Sequenzen, zu denen im RNA-Gemisch ein Transkriptionsprodukt vorliegt, sollten mit den entsprechenden Abschnitten der RNA quantitativ hybridisieren. Der Prozentsatz hybridisierter DNA gibt somit an, wieviel Prozent der DNA im jeweiligen Entwicklungsstadium zu RNA transkribiert worden sind.

Tabelle 4

	Dichte im $CsCl_3$-Gradienten g/cm³	(% GC)	Tm °C[2]	(%GC)	DNA-Fraktionen[3] repet.	interm.	(Cot/2) unique	Multiplizität (unique/repetitiv	Genomgröße (Dalton)[5]
Calliphora[1]									
4 d	1,689	(29,6)	81,6	(30,0)					
5 d			82,4	(32,0)	6%	14%(1,45)	80%(230)	158	$1,87 \times 10^{11}$
P			82,0	(31,0)	6%	14%(0,95)	80%(180)	190	$1,54 \times 10^{11}$
Drosophila[6]									
melanogaster	1,702	(43,0)	85,6	(40,0)	5-10%		90-95%	60	$0,7 \times 10^{11}$
simulans	1,702	(43,0)	85,7	(40,0)	5-10%		90-95%	60	$0,7 \times 10^{11}$
funebris	1,689	(39,0)	84,0	(36,0)	10-15%		85-90%	40	$1,4 \times 10^{11}$
Sarcophaga[6]									
bullata	1,693	(33,0)	82,0	(31,0)	5-10%		90-95%	80	4×10^{11}
Chironomus[7]									
thummi	1,688	(28,6)	80,6	(28,5)	13%	7%	80%	35	$0,87 \times 10^{11}$

[1] Die Renaturierungsreaktionen von Calliphora DNAs wurden in 50% Formamid, 0,75 M NaCl, 0,075 M Natriumcitrat und 0,2 % SDS durchgeführt (Standard: T4 Phagen DNA) während die Renaturierungen von Laird und Mc Carthy (1969) in 0,15 M NaCl und 0,015 M Natriumcitrat (Standard: Bacillus subtilis DNA) und die von Wobus (1975) in 0,12 M Phosphatpuffer (Standard: Proteus mirabilis DNA) durchgeführt wurden.

[2] Die Tm-Werte wurden bei Calliphora-DNA in 0,15 M NaCl und 0,015 M Natriumcitrat bestimmt und der GC-Gehalt nach Mandel und Marmur (1962) berechnet.

[3] Die Einteilung der Calliphora-DNA in Fraktionen wurde durch Zerlegung der Renaturierungskurve entsprechend der von Laird und Mc Carthy (1969) gebrauchten Methode vorgenommen.

Zu Tabelle 4:

[4]Als Maß der Multiplizität der repetitiven Sequenzen dient die Verschiebung der Teilkurven für repetitive
[5]und unique DNA gegeneinander.
[5]Die Komplexität der unique Fraktion beträgt bei Calliphora-Puppen-DNA 1,23 x 10^{11} D. Da diese Fraktion 80 % des gesamten Genoms ausmacht, beträgt die
[6]Genomgröße 1,23 x 10^{11}/0,8 = 1,538 x 10^{11} D.
[6]Die Werte von Drosophila und Sarcophaga DNAs stammen
[7]von Laird und Mc Carthy (1969).
[7]Die Werte von Chironomus DNA stammen von Wobus (1975).

Bei der Hybridisierung von Gesamt-DNA mit Gesamt-RNA (Kern-RNA und cytoplasmatische RNA), werden intermediäre und unique Sequenzen hybridisiert. Hierbei hybridisieren die Transkripte der intermediären DNA-Fraktion, die aus vielen einander ähnlichen Sequenzen besteht, mit einem größeren Teil dieser Sequenzen, als dem, der ihnen genau komplementär ist. Die erste Hybridisierung wird somit vor allem von den intermediären Sequenzen beeinflußt und ihre Ergebnisse können nur untereinander verglichen, nicht aber als absolute Werte betrachtet werden. Aus dem Vergleich geht hervor, daß nach Ecdysterongabe Gesamt-RNA, also RNA, die z.T. unter Ecdysteroneinfluß synthetisiert wurde, mit einem höheren Prozentsatz der DNA hybridisiert als Kontroll-RNA aus Tieren mit einem niedrigen Ecdysteronspiegel. Inkubationszeiten über 7 Tagen führten wahrscheinlich infolge von Degradation zu streuenden Werten.

Besonders interessant war, ob die Zusammensetzung der für Proteine kodierenden mRNA in verschiedenen Entwicklungsstufen und unter Ecdysteroneinfluß Veränderungen zeigt, d.h. ob unterschiedliche DNA-Sequenzen transkribiert werden.

Eukaryotische Genome enthalten repetitive und singuläre Sequenzen. Da wahrscheinlich nur die singulären Sequenzen für mRNA kodieren, mußten, um die Hybridisierung für mRNA aussagekräftig zu machen, die repetitiven DNA-Sequenzen von den singulären Sequenzen abgetrennt werden. Dies geschah mit Hilfe von Hydroxylapatit: mit solchen Säulen können einzel- und doppelsträngige Nukleinsäuren auf Grund ihrer unterschiedlichen Bindungsstärke getrennt werden. Die Isolation der poly(A)-haltigen RNA mit der poly(U)-Sepharose Chromatographie ermöglichte es, zumindest einen Teil der mRNA aus dem Fettkörpergewebe von Calliphora anzureichern.

Da isolierte mRNA und auch poly(A) RNA nur einen kleinen Teil der in der DNA vorliegenden Sequenzen repräsentieren, wird nur ein kleiner Teil DNA bei einer solchen Hybridisierung doppelsträngig und damit gegen S1-Nuklease resistent. Um diesen kleinen Anteil einer darüberhinaus wegen des notwendigen hohen RNA-Überschusses kleinen DNA-Menge genau genug bestimmen zu können, muß die DNA sehr hoch markiert sein. Dies ist durch die "in vitro Jodierung" möglich, bei der nach dem von Orosz und Wetmur vorgeschlagenem schonenden Verfahren spezifische Aktivitäten von 5×10^6 cpm/µg erzielt wurden. Trotz dieses schonenden Verfahrens zeigte die jodierte DNA gewisse, wenn auch geringe Veränderungen in ihrem Renaturierungsverhalten bei höheren Cot-Werten (Abb. 6).

Durch die Hybridisierung von unique DNA mit poly(A)-RNA konnten die Transkriptionsprozentsätze für die gesamte poly(A)-haltige RNA bei verschiedenen Entwicklungsstufen der Larven und unter dem Einfluß des Insektenhormons Ecdysteron miteinander verglichen werden (Abb. 8). Hierbei hybridisierte

a) die poly(A)RNA aus den Fettkörpern von 5 Tage alten Larven mit 1,4 % der unique DNA,
b) die poly(A) RNA aus den Fettkörpern weißer Vorpuppen mit 4,4 % der unique DNA.

Nach Ecdysteronbehandlung hybridisiert

c) die poly(A) RNA von 5 Tage alten Larven mit 3,4 % der unique DNA

Dieser Anstieg kann als Ausdruck bisher nicht in der poly(A) RNA Population vertretenen Gene angesehen werden, was die Hypothese, daß Ecdysteroide durch Aktivierung bestimmter Gene wirken, unterstützt.

Es gibt Hinweise aus elektronenmikroskopischen Beobachtungen, daß Fettkörperzellen von Vorpuppen heterogener sind als die früherer Entwicklungsstadien. Wenn sich eine solche Heterogenität auch in der RNA-Synthese dieser Zellen zeigt, könnte dies zu einem höheren Hybridisierungsprozentsatz der aus den heterogenen Zellen isolierten RNA führen.

Bei der Bewertung der Hybridisierungsergebnisse mit poly(A) RNA muß berücksichtigt werden, daß

a) poly(A)-haltige RNA neben mRNA-Molekülen auch die poly(A)-haltige Kern-RNA, die poly(A)-haltige Precursor-RNA umfaßt und daß
b) poly(A)-haltige RNA möglicherweise nur einen Teil der mRNA darstellt (Milcarek et al., 1974).

Wenn trotzdem deutliche Unterschiede in der Transkriptionsrate gefunden werden, so ist dies ein deutlicher Hinweis auf einen Einfluß des Ecdysterons.

Die aus den Ergebnissen ersichtlichen höheren Hybridisierungsprozentsätze von Ribonukleinsäuren, die aus den Fettkörpern von Tieren mit höherem Ecdysontiter (endo-

gen oder exogen) isoliert wurden, lassen den Schluß zu, daß Ecdysteron sich auf die Synthese von RNAs und (oder) auf den Abbau von RNAs auswirkt, die den höheren Hybridisierungsprozentsatz ausmachen. Während die Hypothese der Regulation durch Transkriptionskontrolle die erste Möglichkeit favorisiert, setzt die zweite Möglichkeit eine dauernde Synthese von RNA-Sorten voraus, die schnell wieder abgebaut werden, sofern sie nicht durch einen noch unbekannten Hormonwirkungsmechanismus geschützt werden.

Neuerdings ist die Lösung des Problems, die Zahl der für Proteine kodierende Gene zu bestimmen, durch biochemische Analysen näher gerückt. Durch Hybridisierung einer poly(A) RNA mit einer synthetisch hergestellten, ihr komplementären cDNA kann die Komplexität der RNA bestimmt werden, analog zu der Komplexitätsbestimmung einer DNA durch Aufnahme ihrer Renaturierungskinetik (Bishop et al., 1974). Bei der Betrachtung der Reaktion geht man davon aus, daß alle poly(A) RNA Moleküle durch die Reverse Transkriptase ihrer Häufigkeit entsprechend oft transkribiert werden.

Hybridisierungsexperimente mit cDNA bei HeLa-Zellen zeigten, daß die mRNA in drei Häufigkeitsklassen eingeteilt werden kann (Bishop et al., 1974).

Die erste Klasse umfaßt wenige Gene, deren mRNA-Kontration aber sehr hoch ist. Hierzu gehört z.B. die mRNA , die für das Protein Globin kodiert. Die zweite Klasse umfaßt ungefähr 100 Gene mit mäßiger mRNA-Konzentration und die dritte Klasse etwa 10 000 Gene mit geringer mRNA Konzentration.

Die Bestimmung der Zahl der aktiven Gene einer Zelle hängt von der genauen Bestimmung des Rot/2-Wertes der am langsamsten reagierenden Komponente ab, was bei nicht klaren Übergängen schwierig ist. Um dieses Problem zu bewältigen, können die Daten auf eine lineare Rot-Skala aufgetragen werden und die Kurve kann mit einem Computerprogramm in bestimmte Abschnitte zerlegt werden. Nach dieser Methode haben Bishop et al. (1974) für HeLa-Zellen 40 000 aktive Gene im Cytoplasma und für Drosophila 4 000 aktive Gene kalkuliert. Levy und Mc Carthy (1975) schätzen die Gesamtzahl aktiver Gene in Drosophila Zellkulturzellen auf 6 900. Der Fehler solcher Kalkulationen kann jedoch einen Faktor von 2 ausmachen, wegen der Schwierigkeit den Rot/2-Wert der langsamsten Komponente zu bestimmen.

Die Kalkulationen hängen darüberhinaus von der Annahme einer mittleren Größe polyadenylierter RNA von 4×10^5 D ab.

Die in der Tabelle 3 wiedergegebene Einteilung der poly(A) RNA Populationen wurde aus der graphischen Darstellung abgeleitet.

Die Zahl der verschiedenen Sequenzen beträgt bei der Vorpuppen-RNA 6 400, was dem Wert für Drosophila sehr nahe kommt, wenn man berücksichtigt, daß die Werte wegen der schwierigen Rot/2-Wertbestimmung noch um den Faktor 2 abweichen können.

Bei der poly(A) RNA von 4 Tage Larven zeigen sich hingegen nur 107 verschiedene Sequenzen , ein Wert, der vergleichsweise niedrig ist. Möglicherweise wurde hier die am langsamsten hybridisierende Komponente nicht erfaßt.

Für die am schnellsten reagierenden Komponenten sowohl von 4 d- als auch von Vorpuppen-cDNA bleibt die Zahl der verschiedenen Sequenzen zu 400 000 D unter 1. Das kann daran liegen, daß die Größe der entsprechenden Sequenzen kleiner als 400 000 ist, aber auch daran, daß der Rot/2-Wert für die am langsamsten hybridisierende Komponente nicht genau erfaßt wurde.

Vergleicht man die poly(A) RNA von 4 Tage alten Larven mit der von Vorpuppen, so läßt sich eine wesentlich komplexere Zusammensetzung der Vorpuppen-poly(A) RNA feststellen, die der von Levy, Mc Carthy (1974) für Drosophila poly(A) RNA ermittelten Zusammensetzung ähnlich sieht.

Die Fragen, die wir uns vor dem Beginn der Arbeit gestellt hatten, waren:

1. Wieviel Prozent der DNA werden zu verschiedenen Entwicklungsstadien bzw. bei verschiedenem Ecdysterontiter transkribiert, und
2. ändert sich die Komplexität der poly(A) RNA unter Einfluß von Ecdysteron?

Nach Charakterisierung der DNA von Calliphora konnte die erste Frage mit den in Abb. 8 wiedergegebenen Hybridisierungsprozentsätzen beantwortet werden. Aus ihnen geht hervor, daß die Transkription der poly(A) RNA vom Entwicklungsstadium und somit vom Ecdysteroidtiter abhängig ist. Die Transkriptionsänderung wirkt sich, wie die Hybridisierung von Gesamt-RNA mit Gesamt-DNA zeigt, sowohl auf poly(A) RNA, als auch auf andere RNA-Species aus. Die Ergebnisse, nämlich die Synthese verschiedener RNA-Gruppen in Abhängigkeit vom Alter der Larven oder Entwicklungsfaktoren wie dem Hormon Ecdysteron ergeben deutliche Hinweise auf eine Transkriptionskontrolle, schließen aber eine anschlies-

sende Posttranskriptionskontrolle keineswegs aus.

Frage 2 kann unter den vorher erwähnten Vorbehalten dahingehend beantwortet werden, daß sich bei den untersuchten Stadien deutliche Komplexitätsunterschiede zeigen.

Ein höherer Prozentsatz des Hybrids (etwa die Hälfte des gesamten gebildeten Hybrids) aus poly(A) RNA von 4 Tage alten Larven mit ihrer cDNA bildet sich in einem niedrigen Cot-Bereich, was dafür spricht, daß hier eine für Protein kodierende poly(A) RNA stark vertreten ist.

Interessant ist in diesem Zusammenhang der Befund, daß bei 4 Tage alten Larven von Calliphora die Synthese des Proteins Calliphorin im Fettkörper ihr Maximum hat (Sekeris und Scheller, 1977).

Bei der Hybridisierung der poly(A) RNA aus Vorpuppen zeigt sich keine RNA so häufig vertreten. Hier ist die Zahl der in der poly(A) RNA vertretenen Gene wesentlich höher als bei 4 Tage alten Larven, was dafür sprechen kann, daß hier eine ganze Gruppe von Genen durch Ecdysteroneinfluß zur Transkription angeregt wird.

5. Zusammenfassung

Der Einfluß des Insektenhormons Ecdysteron auf die Zusammensetzung der Fettkörper-RNA von Calliphora erythrocephala wurde durch Hybridisierungsexperimente untersucht.

Eine DNA-Untersuchung ergab einen GC-Gehalt von 31 % und einen Tm-Wert von 82° C und diente der Festlegung der für die folgenden Hybridisierungen günstigsten Inkubationstemperaturen.

DNA-DNA Hybridisierungen zeigten, daß Calliphora DNA eine kinetische Komplexität von $1{,}36 \times 10^{11}$D und eine Genomgröße von $1{,}7 \times 10^{11}$D hat und damit zwischen den Werten für die Dipteren Drosophila und Sarcophaga liegt (Tabelle 4).

Hybridisierungen zwischen jodierter Gesamt-DNA und Gesamt-RNA ergaben einen höheren Hybridisierungsprozentsatz bei der RNA von ecdysteronbehandelten Tieren und damit einen deutlichen Hinweis auf eine Stimulierung der Transkription vorher "stummer" Gene durch Ecdysteron.

Die Hybridisierungen zwischen jodierter unique DNA und poly(A) RNA zeigten ebenfalls einen höheren Hybridisierungsprozentsatz bei RNA aus ecdysteronbehandelten Tieren oder von Tieren mit hohem endogenen Ecdysterontiter und lassen den Schluß zu, daß Ecdysteron zu einer qualitativ komplexeren RNA-Population führt.

Zur Überprüfung der Zusammensetzung der poly(A) RNA-Populationen wurden mit poly(A) RNAs von Vorpuppen und von 4 Tage alten Larven als Templates cDNAs syn-

thetisiert und gegen ihre poly(A) RNA hybridisiert. Es zeigte sich, daß die poly(A) RNA von Vorpuppen aus 6400 verschiedenen Sequenzen besteht, was den für Drosophila ermittelten Werten entspricht. Sie ist wesentlich komplexer als die poly(A) RNA von 4 Tage alten Larven.

Abkürzungen

Ac	Acetat
cpm	Impulse pro Minute
D	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cDNA	komplementäre DNA
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
GC	Guanin + Cytosin
HTP	Hydroxylapatit
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (49 : 49 : 2)
RNA	Ribonukleinsäure
hnRNA	heterogene Kern-Ribonukleinsäure
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tm-Wert	Schmelzpunkt
TNS	Triisopropylnaphthalinsulfonsäure
Tris	Trishydroxymethyl-aminomethan
4d-L	4 Tage alte Larven
P	Puppen

Literaturverzeichnis

Angerer, R.C., E.H. Davidson und R.J. Britten, 1975. DNA sequence organisation in the Mollusc Aplysia California. Cell 6, 29-39

Beato, M., J. Homoki, J. Lukacs und C.E. Sekeris, 1968. Increased template activity for RNA synthesis of rat liver nuclei incubated with cortisol in vitro. Z. Physiol. Chem. 349, 1099-1104.

Bendich, A.J. und B.J. Mc Carthy, 1970. Ribosomal RNA homologies among distantly related organisms. Proc. Nat. Acad. Sci. 65, 349-356

Bishop, J.O., J.G. Morton, M. Rosbash und M. Richardson, 1974. Three abundance classes in Hela cell messenger RNA. Nature 250, 199-204

Breuer, C.B. und J.R. Florini, 1966. Effects of ammonium sulfate, growth hormone, and testosterone propionate on ribonucleic acid polymerase and chromatin activities in rat skeletal muscle. Biochem. 5, 3857-3865

Britten, R.J. und D.E. Kohne, 1968. Repeated sequences in DNA. Science 161, 529-540

Britten, R.J. und D.E. Kohne, 1969. Repetition of nucleotide sequences in chromosomal DNA. In: Handbook of Molecular Cytology, Lima-de-Faria A. (Ed.), North Holland, Amsterdam 21-36

Britten, R.J. und E.H. Davidson, 1971. Repetitive and non repetitive DNA sequences and a speculation on the origins of evolutionary novelty. Quart. Rev. Biol. 46, 111-133

Church, R.B. und B.J. Mc Carthy, 1970. Unstable nuclear RNA synthesis following estrogen stimulation. Biochim. Biophys. Acta 199, 103-114

Clever, U. und P. Karlson, 1960. Induktion von Puffveränderungen in den Speicheldrüsenchromosomen von Chironomus tentans durch Ecdyson. Exptl. Cell Res. 20, 623-626

Congote, L.F., C.E. Sekeris und P. Karlson, 1970. Alterations of the nature of RNA synthesized in isolated fat body cell nuclei as a result of ecdysone and juvenile hormone action. Z. Naturforsch. 25b, 279-284

Congote, L.F. und D. Trachewski, 1972. Qualitative changes in nuclear RNA from rat kidney cortex after aldosterone treatment. Biochem. Biophys. Res. Comm. 46, 957-963

Couch, R.M. und K.M. Anderson, 1973. Rat ventral prostate chromatin. Effect of androgens on its chemical composition, physical properties, and template activity. Biochemistry 12, 3114-3121

Cox, R.F., M.E. Haines und N.H.C. Carvey, 1973. Modification of the template capacity of chick oviduct chromatin for form-B RNA polymerase by estradiol. Eur. J. Biochem. 32, 513-524

Dahmus, M. und J. Bonner, 1965. Increased template activity of liver chromatin, a result of hydrocortisone administration. Proc. Nat. Acad. Sci. 54, 1370-1375

Davidson, E.H., B.R. Hough, C.S. Amenson und R.J. Britten, 1973. General interspersion of repetitive with non repetitive sequence elements in the DNA of Xenopus. J. Mol. Biol. 77, 1-24

Davies, P. und K. Griffiths, 1973. Stimulation in vitro of prostatic ribonucleic acid polymerase by 5α-dihydrotestosteron-receptor complexes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 53, 373-382

Drews, J. und G. Brawerman, 1967. Alterations in the nature of ribonucleic acid synthesized in rat liver during regeneration and after cortisol administration. J. Biol. Chem. 242, 801-808

Doenecke, D. und C.E. Sekeris, 1970. Effects of cortisol on RNA synthesis as detected by hybridisation with differentially renaturing DNA species. FEBS Letters 8, 61-64

Firtel, R.A. und J. Bonner, 1972. Characterization of the genome of the cellular slime mold Dictyostelium discoideum. J. Mol. Biol. 66, 339-361

Forte, L. und F.J. Landon, 1968. Aldosterone induced RNA synthesis in the adrenalectomized rat kidney. Biochim. Biophys. Acta 157, 303-309

Fragoulis, E.G. und C.E. Sekeris, 1975. Translation of mRNA for 3,4-dihydroxyphenylalanine decarboxylase isolated from epidermis tissue of Calliphora vicina R.-D. in an heterologous system. Eur. J. Biochem. 51, 305-316

Gall, I.G., 1969. The genes for ribosomal RNA during oogenesis. Genetics 61, Suppl. 1, 121-132

Georgiev, G.P., 1969. On the structural organisation of operon and the regulation of RNA synthesis in animal cells. J. Theoret. Biol. 25, 473-490

Getz, M.J.,G.D.Birnie, B.D. Young, E. Mac Phail und J. Paul, 1975. A kinetic estimation of base sequence complexity of nuclear poly(A) containing RNA in mouse friend cells. Cell 4, 121-129

Graham, D.E., B.R. Neufeld, E.H. Davidson und R.J. Britten, 1974. Interspersion of repetitive and non-repetitive DNA sequences in the sea urchin genome. Cell 1, 127-137

Harrison, P.R., G.D. Birnie, A. Hell, S. Humphries, B.D. Young und J. Paul, 1974. Kinetic studies of gene frequency. Use of a DNA copy of reticulocyte 9S RNA to estimate globin gene dosage in mouse tissues. J. Mol. Biol. 84, 539-554

Jacob, F. und J. Monod, 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. J. Mol. Biol. 3, 318-356

Kacian, D.L. und S. Spiegelman, 1973. Purification and detection of reverse transcriptase in viruses and cells. Methods in Enzymology 29E, 150-173

Karlson, P. und G. Peters, 1965. Zum Wirkungsmechanismus der Hormone. Der Einfluß des Ecdysons auf den Nukleinsäurestoffwechsel von Calliphora-Larven. Gen. Comp. Endocrinol. 5, 252-259

Laird, C.D. und B.J. Mc Carthy, 1968. Nucleotide sequence homology within the genome of Drosophila melanogaster. Genetics 60, 323-334

Laird, C.D. und B.J. Mc Carthy, 1969. Molecular characterization of the Drosophila genome. Genetics 63, 865-882

Lang, N., P. Herrlich und C.E. Sekeris, 1968. On the mechanism of hormone action VII. Induction by cortisol of a messenger RNA coding for tyrosine-x-ketoglutarate transaminase in an in vitro system. Acta Endocrin. 57, 33-44

Levy, B.W. und B.J. Mc Carthy, 1975. Messenger RNA complexity in Drosophila melanogaster. Biochemistry 14, 2440-2444

Liew, C.E., D.K. Liu and A.G. Gornall, 1972. Effects of aldosterone on RNA polymerase in rat heart and kidney nuclei. Endocrinol. 90, 488-495

Mandel, M. und J. Marmur, 1968. Use of UV-absorbance-temperature profile for determining the guanine plus cytosine content of DNA. Methods in Enzymology 12b, 195-206

Markov, G. und J.G. Ivanov, 1974. Hydroxyapatite column chromatography in procedures for isolation of purified DNA. Anal. Biochem. 59, 555-563

Marmaras, V.J. und C.E. Sekeris, 1972. Pattern and activity of polyribosomes from the integument of blowfly larvae during development. Expt. Cell Res. 75, 143-153

Marmur, J. und P. Doty, 1962. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. J. Mol. Biol. 5, 109-118

Marmur, J., R. Rownd und C.C. Schildkraut, 1963. Denaturation and renaturation of DNA. Prog. Nucleic Acid Res. 1, 232-300

Mc Carthy, B.J. und R.B. Church, 1970. The specificity of molecular hybridization reactions. Ann. Rev. Biochem. 39, 131-150

Mc Carthy, B.J. und B.L. Mc Conaughy, 1968. Related base sequences in the DNA of simple and complex organisms. I. DNA/DNA duplex formation and the incidence of partially related base sequences in DNA. Biochem. Genetics 2, 37-53

Mc Conaughy, B.L., C.D. Laird und B.J. Mc Carthy, 1969. Nucleic acid reassociation in formamide. Biochemistry 8, 3289-3294

Milcarek, C., R.P. Price und S. Penman, 1974. The metabolism of a poly(A) minus mRNA fraction in HeLa cells. Cell 3, 1-10

Molloy, G.R., W. Jelinek, M. Salditt und J.E. Darnell, 1974. Arrangement of specific oligonucleotides within poly(A) terminated hnRNA molecules. Cell 1, 43-53

Moritz, K.B. und G.E. Roth, 1976. Complexity of germ-line and somatic DNA in Ascaris. Nature 259, 55-57

O'Malley, B.W., 1969. Hormonal regulation of nucleic acid and protein synthesis. Trans. N.Y. Acad. Sci. 31, 478-503

O'Malley, B.W. und W.L. Mc Guire, 1969. Progesterone-induced synthesis of a new species of nuclear RNA. Endocrinol. 84, 63-68

O'Malley, B.W. und W.T. Schrader, 1976. The receptors of steroid hormones. Scientific American 234, 32-43

Orosz, J.M. und J.G. Wetmur, 1974. In vitro iodination while minimizing degradation; use of buoyant density shifts for DNA-DNA hybrid isolation. Biochemistry 13, 5467-5473

Paul, J., 1972. General theory of chromosome structure and gene activation in eucaryotes. Nature 238, 444-446

Reeves, R., 1976. Ribosomal genes of Xenopus laevis. Evidence of nucleosomes in transcriptionally active chromatin. Science 194, 529-532

Scheller, K. und P. Karlson, 1977. Effects of ecdysteroids on RNA synthesis of fatbody cells in Calliphora vicina. J. Insect Physiol. 23, 285-291

Scheller, K. und P. Karlson, 1977. Synthesis of poly(A) containing RNA induced by ecdysterone in fat body cells of Calliphora vicina. J. Insect Physiol. 23, 435-440

Schildkraut, C.L., J. Marmur und P. Doty, 1961. Determination of the base composition of DNA from its buoyant density in CsCl. J. Mol. Biol. 4, 430-443

Sekeris, C.E. und N. Lang, 1964. Induction of dopa-decarboxylase activity by insect messenger RNA in an in vitro amino-acid incorporating system from rat liver. Life Sciences 3, 625-633

Sekeris, C.E., N. Lang und P. Karlson, 1965. Der Einfluß von Ecdyson auf den RNA-Stoffwechsel in der Epidermis der Schmeißfliege Calliphora erythrocephala. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 341, 36-43

Sekeris, C.E. und K. Scheller, 1977. Calliphorin, a major protein of the blowfly: correlation between the amount of protein, its biosynthesis and the titer of translatable Calliphorin mRNA during development. Developmental Biology 59, 12-23

Sutton, W.D. und M. Mc Gallum, 1971. Mismatching and the reassociation rate of mouse satellite DNA. Nature New Biol. 232, 83-85

Thamer, G. und P. Karlson, 1972. Nachweis der Proteinbindung von Ecdyson bei der Schmeißfliege Calliphora erythrocephala. Z. Naturforsch. 27b, 1191-1195

Tienkuo, M., C.G. Sahasrabuddhe und G.F. Saunders, 1976. Presence of messenger specifying sequences in the DNA of chromatin subunits. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 73, 1572-1575

Vassart, G., H. Brocas, P. Nokin und J.E. Dumont, 1973. Translation in Xenopus oocytes of thyroglobulin mRNA isolated by poly(U)-sepharose affinity chromatography. Biochim. Biophys. Acta 324, 575-580

Vogt, V.M. 1973. Purification and further properties of single-strand-specific nuclease from Aspergillus oryzae. Eur. J. Biochem. 33, 192-200

Waring, M.J. und R.J. Britten, 1966. Nucleotide sequence repetition: a rapidly reassociating fraction of mouse DNA. Science 154, 791-793

Wetmur, J.G. und N. Davidson, 1968. Kinetics of renaturation of DNA. J. Mol. Biol. 31, 349-370

Willie, J.J., 1972. Selective amplification of repetitive DNA in the eucaryote Tetrahymena. Biochem. Biophys. Res. Commun. 46, 692-699

Wobus, U., 1975. Molecular characterization of an insect genome Chironomus thummi. Eur. J. Biochem. 59, 287-293

Lebenslauf

16.3.1948	geboren in Dortmund-Mengede als Sohn des kaufmännischen Angestellten Paul Mascheck und seiner Frau Hildegard, geb. Thiel.
1954-1959	Besuch der Haferfeld-Volksschule in Essen-Steele
1959-1967	Besuch des städtischen neusprachlichen Gymnasiums in Langenberg
15.7.1967	Reifeprüfung
1967-1968	Studium der Chemie an der TU Clausthal-Zellerfeld
1968-1970	Pharmazeutisches Praktikum in der Adler-Apotheke in Langenberg
3.9.1970	Pharmazeutische Vorprüfung in Düsseldorf
1970-1973	Studium der Pharmazie in Marburg
5.10.1973	Pharmazeutisches Staatsexamen
1973-1978	Studium der Humanbiologie an der Philipps-Universität in Marburg
1.4.74	Beginn der vorliegenden Doktorarbeit am Institut für Physiologische Chemie der Philipps-Universität unter Leitung von Herrn Prof. Dr. P. Karlson

Meine akademischen Lehrer waren:

Brehler, Bues, Dehnike, Ebel, Hartke, Kating, Koransky, List, Mayer, Nultsch, Otto, Schmitz, Schneider, Seitz, Willuhn

Aziz, Beato, Braun, Gallwitz, Hensel, Karlson, Koolman, von Kraft, Niessing, Scheller, Schwick, Seifart, Wiegandt.

Druck: D. Gräbner, 8602 Altendorf – Telefon: 09545 / 8791